

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE CLERMONT FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR

LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

présentées et soutenues publiquement au mois d'avril 1967

par

Georges BÉTAIL
Pharmacien
Licencié ès sciences

né le 25 juillet 1934 à Marcenat (Cantal)

- 1 THESE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA CONSTITUTION
DES EXTRAITS PLACENTAIRES SELON FILATOV.
—ÉTUDE ANALYTIQUE
—ÉTUDE ANTIGÉNIQUE, ÉTENDUE A
D'AUTRES PRÉPARATIONS INJECTABLES.
- 2 THESE. — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Président : M. COULET, Professeur

Membres du jury : M. TRONCHE, Professeur
M. VAURS, Professeur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ANNEE 1967

N°

THÈSES

PRÉSENTÉES

A L'UNIVERSITÉ DE CLERMONT FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

POUR

LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'État)

présentées et soutenues publiquement au mois d'avril 1967

par

Georges BÉTAIL
Pharmacien
Licencié ès sciences

né le 25 juillet 1934 à Marcenat (Cantal)

- 1 THESE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA CONSTITUTION
DES EXTRAITS PLACENTAIRES SELON FILATOV.
—ÉTUDE ANALYTIQUE
—ÉTUDE ANTIGÉNIQUE, ÉTENDUE A
D'AUTRES PRÉPARATIONS INJECTABLES.
- 2 THESE. — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Président : M. COULET, Professeur
Membres du jury : M. TRONCHE, Professeur
M. VAURS, Professeur

THESIS

A UNIVERSITEIT DE LEIDEN
FACULTÉ DE MEDICINE
ET DE PHARMACIE

LEIDEN, 1881



UNIVERSITE DE CLERMONT
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Doyen : G. MEYNIEL

Assesseur : M. COULET

Directeur Honoraire : M. MERLE

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET, MM. BUREAU, FOURNIER
GAUTHIER, POMMÉ

I - Professeurs Titulaires

MM. BARRIER	- Clinique Chirurgicale A
BASTIDE	- Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BAUDON	- Clinique Obstétricale
BERGERON	- Pathologie Médicale
COULET	- Botanique et Microbiologie
CUVELIER	- Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE	- Biochimie Médicale
DAUPHIN	- Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
DELAGE	- Anatomie Pathologique
FEBVRE	- Pharmacie Galénique
GRAS	- Thérapeutique
JACQUEMET	- Technique Chirurgicale
JALLUT	- Séméiologie Médicale
LATAIX	- Pathologie Chirurgicale
MEYNIEL	- Biophysique Médicale
MOLINA	- Clinique Pneumo-phtisiologique
PETIT	- Médecine Légale et Médecine Sociale
POROT	- Clinique Neurologique et Psychiatrique
POURRAT	- Matière Médicale
ROUHER	- Clinique Ophtalmologique
TERRASSE	- Clinique Médicale B
THIEBLOT	- Physiologie
THOMAS	- Oto-Rhino-Laryngologie
TRONCHE	- Pharmacie Chimique
TURCHINI	- Histologie et Embryologie
VAURS	- Bactériologie et Hygiène
WILLEMIN-CLOG	- Clinique Médicale Infantile

II - Professeur titulaire à titre personnel

M. VIALLET	- Electro-Radiologie
------------	----------------------

III - Professeurs sans Chaire

MM. ALFIERI	- Biophysique Médicale
BERGER	- Chimie Analytique
CLUZEL	- Bactériologie
DUCHENE-MARULLAZ	- Physiologie
GERMAIN	- Clinique Chirurgicale B.

IV- Maîtres de Conférences Agrégés

M. BOSSY	- Anatomie
Mle CHATONIER	- Chimie minérale et minéralogie
Mme GAILLARD	- Physique Pharmaceutique
M. MENUT	- Pédiatrie et Puériculture
Mme MOINADE	- Médecine Générale et Thérapeutique
M. PIGNIDE	- Médecine Générale et Thérapeutique
Mme POURRAT	- Botanique
M. VENRIES DE LAGUILLAUMIE	- Anatomie Pathologique

V - Agrégés

MM. CHAMPEIX	- Médecine Légale et Médecine du Travail
FOURRIER	- Orthopédie
HOUDARD	- Chirurgie Générale
JANNY	- Neuro-Chirurgie
MERCIER	- Chirurgie Générale
Mle RAMPON	- Médecine Générale et Thérapeutique
MM. RENARD	- Pneumo-phtisiologie
TOURNILHAC	- Neurologie et Psychiatrie.

Attaché Principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner, ni approbation ni improbation (délibération en date du 6 juin 1956).

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur M. COULET
Assesseur de Monsieur le Doyen
Professeur de Botanique et Microbiologie
Biologiste des Hôpitaux.

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur P. TRONCHE
Professeur de Pharmacie Chimique.

Monsieur le Professeur R. VAURS
Professeur de Bactériologie et Hygiène.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA CONSTITUTION
DES EXTRAITS PLACENTAIRES SELON FILATOV :

- ETUDE ANALYTIQUE
- ETUDE ANTIGENIQUE, ETENDUE A
D'AUTRES PREPARATIONS INJECTABLES.

Depuis FILATOV, on désigne sous le nom de " stimulines biogènes " des substances qui prendraient naissance à la suite des transformations biochimiques subies par les tissus conservés dans des conditions défavorables. Ces " stimulines " sont thermostables et il est possible d'en retrouver les effets dans un extrait aqueux obtenu à partir de tout tissu vivant traité selon la technique de FILATOV.

Les travaux les plus nombreux consacrés à cette thérapeutique originale sont le fait de cliniciens essentiellement attachés à l'étude des effets thérapeutiques plus qu'à celle des substances qui peuvent en être le support. Néanmoins, plusieurs auteurs ont abordé, sous des angles divers, l'identification chimique. Nous avons entrepris, pour notre part, cette étude d'une manière systématique, en nous attachant à identifier les substances entrant dans la composition des extraits placentaires et pouvant expliquer leurs effets.

Cette étude a été conduite sur des lots variés d'extraits placentaires, dont la préparation, répartie sur plusieurs années, a fait appel chaque fois à des mélanges de placentas humains et à titre comparatif à des placentas bovins.

Nos recherches ont porté sur un extrait placentaire selon FILATOV aimablement mis à notre disposition par le Professeur TRONCHE du laboratoire de Pharmacie chimique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand, que nous tenons à remercier ici.

Notre reconnaissance va également au Professeur MOULLEC du Centre National de Transfusion Sanguine, qui a bien voulu nous conseiller dans la rédaction du chapitre relatif aux antigènes de groupe sanguin.

Les Professeurs SVENNERHOLM de l'Université d'Upsala, et COLOBERT de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Lyon, nous ont fourni les échantillons d'acide sialique et d'acide nucléique indispensables à notre expérimentation, nous leur exprimons notre vive gratitude.

I N T R O D U C T I O N



C'est en 1933 que FILATOV (1) publia les éléments de sa théorie concernant la thérapeutique par les tissus. Le principe directeur de cette thérapeutique lui avait été suggéré par l'observation suivante :

A l'occasion de greffes pour taies de la cornée, l'utilisation de greffons conservés en glacière permettait une réussite meilleure et plus régulière de la greffe, tandis qu'au bord du greffon la taie devenait moins opaque et s'éclaircissait sur un à deux millimètres.

Le fragment mis en place ajoutait donc à son rôle de " hublot transparent dans une cornée opaque " des propriétés biologiques nouvelles que l'auteur rapporta à la conservation dans des conditions de vie difficile et qui se traduisent " par un apport de principes biogènes, favorisant la nutrition, la reconstitution biochimique de la cornée, et excitant tous les processus de régénération ". FILATOV élargit alors son expérience en multipliant les applications ainsi que la nature et la qualité des implants : peau, muscle, tissu nerveux, tissu glandulaire, matériel d'origine végétale (feuille d'aloès), boues des golfes marécageux de la Russie méridionale.

L'auteur en conclut que " tout tissu vivant, humain, animal ou végétal, séparé de l'organisme et mis en présence de facteurs qui entravent sa vie, mais ne le tuent pas, subit une reconstruction biochimique : il se forme des substances qui sont des stimulants pour les processus biologiques, qui permettent aux tissus de conserver leur vie dans des conditions défavorables. Et c'est pourquoi, écrit FILATOV, je les ai appelées substances de résistance, ou d'après leur origine, stimulants biogènes ".

Ces " stimulants biogènes " ne sont pas spécifiques, et ils ont la propriété, lors de leur introduction par telle ou telle voie dans un organisme déficient, d'en exciter les réactions vitales.

FILATOV et ses collaborateurs (2) s'attachèrent à préciser également les points suivants :

Conditions de production :

Tout milieu qui offre les conditions d'une vie difficile mais non abolie convient à la production des biostimulines : froid, rayons X, ultra-violet, petits traumatismes répétés, certains agents chimiques, etc...

Pour des raisons de facilité et de maniabilité, c'est le froid qui est le plus employé : 6 jours entre + 2° C et + 4° C. En effet, le froid protège les tissus conservés de l'action microbienne en même temps qu'il freine les processus biochimiques habituels.

Choix des tissus :

Les stimulines ne sont spécifiques en aucune manière ni sous le rapport histologique, ni sous le rapport de l'espèce (action des stimulines végétales sur les animaux, action d'un animal à l'autre).

De même elles pourront naître de tout tissu vivant. Il faut néanmoins faire une place à part pour le placenta humain, en raison de sa facilité d'obtention qui a permis de préparer diverses formes médicamenteuses.

Formes et obtention des médicaments destinés à la thérapeutique tissulaire :

On peut distinguer les préparations de placenta total, plutôt réservées aux implantations et aux applications locales, et les extraits placentaires, destinés aux injections, à l'obtention des pomades, suppositoires et lavements.

- Préparations de placenta total :

Les premières connues sont celles proposées par FILATOV (3), qui conserve des fragments de placenta humain en

glacière pendant 7 jours, pour permettre au tissu en souffrance de libérer des biostimulines. Les fragments sont ensuite maintenus pendant 1 heure à 70° C, puis stérilisés à l'autoclave. On notera qu'ici aucune fraction du tissu n'est éliminée, si ce n'est le liquide exsudé lors du chauffage à 70° C, mais on peut aussi prévoir que de nombreux constituants du placenta ne résisteront pas au chauffage et à la stérilisation.

Le placenta sec de BELTZ et BUATOIS, cité par GATÉ et VACHON (4), est un placenta en fragments, préalablement maintenu au froid pour la mise en liberté des biostimulines, puis desséché sous vide à 70° C et 40° C. Les fragments secs sont ensuite stérilisés à l'autoclave, selon les auteurs.

Le placenta frais préconisé par RENARD (5), correspond à un placenta conservé en glacière, en présence de pénicilline, sans aucun chauffage ultérieur.

Enfin, la lyophilisation permet la conservation sous forme stabilisée de la pulpe de placenta ayant subi au froid la maturation nécessaire.

Les extraits totaux lyophilisés correspondent, selon COTTE et BUREAU (6), à l'organe total broyé dans les 3 heures suivant son prélèvement. La pulpe subit alors une série de congélations et de décongélations, permettant l'éclatement des cellules et l'obtention d'un suc tissulaire qui est ensuite placé dans les conditions édictées par FILATOV. L'extrait total contiendra donc, d'une part, les biostimulines, d'autre part, les substances tissulaires les plus délicates pour lesquelles la lyophilisation assurera une conservation parfaite.

Il y a une nette opposition entre les préparations utilisées fraîches ou stabilisées à basse température, et celles qui subissent un traitement thermique : l'activité hormonale et enzymatique, l'apport protidique vont différer des unes aux autres.

- Extraits placentaires :

FILATOV (7), en même temps qu'il préconisait l'emploi du placenta total, décrivait un mode de préparation d'un extrait placentaire beaucoup plus maniable, puisque liquide et injectable : le placenta conservé pendant 6 jours en glacière est broyé en présence de 10 fois son poids d'eau distillée, et abandonné pendant 1 heure à la température ordinaire. Le mélange subit ensuite 2 chauffages progressifs jusqu'à la température de l'ébullition qu'on maintient pendant 2 minutes. Le liquide clair finalement obtenu est réparti en ampoules et stérilisé à 120° C.

La plupart des extraits placentaires dont on dispose doivent à la technique de FILATOV l'essentiel de leur mode de préparation. On peut citer comme s'en écartant sensiblement, celui

de NECHITCH (8) qui, après conservation à froid, remplace la macération à température ordinaire de FILATOV par une autolyse du tissu à 50-60° C, jusqu'à immersion de la pulpe dans son seul suc.

RAUCH, ZENDER et KOSTLIN (9) étudient l'extrait " LUCCHINI " ; si la maturation à froid est respectée, tout traitement thermique ultérieur est rejeté ; la préparation se borne à une extraction à froid et la stérilité est obtenue par filtration.

Enfin, même dans l'ignorance de la nature exacte des principes actifs, et peut-on dire aussi pour essayer de la vaincre, certains ont cherché à utiliser des solvants organiques susceptibles, en entraînant ces " stimulines biogènes ", de les séparer de trop de substances inactives qui les accompagnent : c'est l'acétone que proposent UZON et DZIRI (10). L'extrait acétonique évaporé à sec est repris par l'eau salée pour aboutir à la forme utilisable. C'est le mélange " hydro-glycéro-glycolique " qui est cité par COTTE et BUREAU (11).

Sans être exhaustif, ce rappel des principales techniques suffit à expliquer la variété qu'on observe dans la composition des extraits placentaires, et qu'on pourra juger par le tableau suivant, dont nous empruntons les chiffres à RAUCH, ZENDER et KÖSTLIN (12) : la colonne A correspond à un extrait préparé à froid, les colonnes B, C, et D, à des extraits à chaud, utilisés en clinique et obtenus selon les principes de FILATOV.

Constituants		Extraits			
		A	B	C	D
Azote total	mg/100	76	32	16	42
Urée	"	12	3,4	5	0,06
Acide urique	"	0,24	0,06	0,11	0,03
Créatinine	"	0,04	0	0	0
Cholestérol	"	42	19	10	10
P minéral	mEq/1	4,8	5,4	5	15,6
Ca		2,4	12,5	10	3
Phosphatase alcaline					
(unités Bodansky)		8,75	0	0,35	0
Phosphatase acide					
(unités King)		4,8	0,5	0	0
Protéines (fractions en %)					
albumine		22,5	0	0	0
globulines α 1 et 2		9,5	28,2	56,5	35,8
globulines β		55,5	?	18,7	0
globulines γ		12,5	71	24,8	64,2

On retiendra surtout de ces chiffres que des constituants disparaissent totalement au cours du chauffage des extraits, parmi lesquels on peut citer : la créatinine, les phosphatases, la fraction albumine. D'autres au contraire, semblent s'y accumuler à la faveur du traitement par la chaleur : c'est le cas du phosphore et du calcium.

La connaissance de ces faits permet de comprendre que d'une préparation à l'autre les effets secondaires ne manqueront pas de varier, que, par exemple, l'apport hormonal de telle préparation fraîche s'ajoutera à l'action trophique, ou que la richesse en protéides de telle autre risque de provoquer quelques sensibilisations.

Comme il est démontré depuis FILATOV (13), et nous n'en citerons comme preuve que celles établies avec l'extrait que nous avons retenu par CUVELIER, TRONCHE (14), et TERRASSE, CUVELIER et CHARDON (15), les extraits chauffés conservent le pouvoir de stimulation. Nous nous proposons de préciser leur composition, mais les résultats précédemment rapportés nous imposent de décrire, au préalable, le mode d'obtention de l'extrait étudié.

Préparation de l'extrait placentaire étudié :

Les placentas humains, normaux d'apparence, et provenant de parturientes en bonne santé, au terme d'une grossesse normale, sont congelés et conservés à - 5° C pendant 8 jours au moins, 30 jours au plus. Après décongélation, les organes sont hachés. La pulpe, additionnée d'un égal poids d'eau déminéralisée sur résine est alors portée à l'ébullition maintenue pendant 2 minutes, et filtrée avec expression. Le filtrat est ajusté à pH 5,2 à l'aide d'acide acétique et porté une nouvelle fois à l'ébullition : le précipité protidique est séparé par filtration, le liquide clair est neutralisé par la soude et additionné de charbon absorbant. On fait bouillir pour la troisième fois, on filtre et répartit en ampoules stérilisables. Il s'agit là d'un extrait concentré, à poids égal, jamais utilisé tel quel. L'extrait injectable en dérive par simple dilution au demi ou au dixième. Nos déterminations ont été faites exclusivement sur cette forme concentrée.

Emploi thérapeutique :

La thérapeutique tissulaire selon FILATOV (16) a rapidement dépassé les limites de l'ophtalmologie où elle était née ; nous indiquons ses principales applications actuelles dans son domaine d'origine, puis dans les différents chapitres de la pathologie :

1) en ophtalmologie :

- dans les dégénérescences chorioretiniennes, en particulier, FILATOV (17),
- dans la rétinite pigmentaire (FILATOV (18), NEUEUSCHWANDER (19), SOURDILLE (20)) ,
- dans les affections du segment antérieur s'accompagnant de troubles trophiques (MERCIER (21)), dans le trachome à ses divers stades, SEGAL et PAVE (22) .

2) en pathologie générale :

Il convient de mettre l'accent sur le traitement local des brûlures et des escharres (BARKHAL et SKOLIAR (23), WERTHEIMER (24)), mais on peut ajouter à l'actif de la thérapie tissulaire divers succès dans d'autres domaines : ulcères gastro-duodénaux (VACHON et RENDU (25)), affections vasculaires (ARQUINT et HAUSER (26)), psoriasis (MEYER (27)), rhumatologie (TORTA (28)) .

Nature des biostimulines - Tests d'activité des extraits placentaires :

Dans l'état actuel de nos connaissances, la nature chimique des biostimulines est encore imparfaitement précisée. A défaut de pouvoir rattacher son activité à une fonction chimique précise, on peut constater que la thérapeutique tissulaire n'est pas une forme de protéinothérapie ; il n'est pas davantage possible de confondre les biostimulines avec des enzymes ou des hormones.

En effet, les extraits tissulaires gardent leurs propriétés après précipitation des protéides par les procédés chimiques usuels et il est possible de préparer des extraits tissulaires dont la teneur protéique est inférieure à 0,06 p. 100 (DELANNOY (29)) .

En dehors des protéides précipitables, la présence d'acides aminés et de peptides a été reconnue par BADINAND et MALLEIN (30) . A la suite des travaux de RATSIMAMANGA sur les extraits d'organes nous pensons, avec COTTE et BUREAU (31) , que l'activité des extraits placentaires est due à un ensemble synergique ou les acides aminés jouent un rôle.

Un chauffage de 60 mn à 120° C n'altère pas les biostimulines, on ne peut donc les assimiler à des enzymes.

On pourrait penser à certains dérivés hormonaux : dans le cas particulier des extraits placentaires, on doit remarquer

avec SAUNIER, cité par GATE et VACHON (32), qu'ils ne manifestent pas sur l'animal les propriétés des gonadotrophines. En outre, il ne semble pas que la réaction de LIBERMAN de mise en évidence du noyau stérol soit suffisamment positive, et que celle de ZIMMERMANN employée dans les conditions de caractérisation des 17 cétostéroïdes ne le soit ni constamment ni notablement.

Différents auteurs ont tenté de rapporter l'activité des biostimulines à des substances telles que les acides dicarboxyliques, les acides cinnamique et oxycinnamique (FILATOV et BIBER (33)), les polypeptides (ARQUINT et HAUSER (34)), les acides nucléiques ; mais dans ce dernier cas, du moins, le remplacement de l'extrait placentaire par un acide zymonucléique n'a abouti qu'à un échec thérapeutique (GATÉ et VACHON (35)).

S'il n'est pas possible de préciser la nature chimique des biostimulines, on peut apporter la preuve de leur existence par des tests biologiques.

Selon IANICK, chez les axolotls, le frayage est possible en hiver par implantation d'un extrait du tissu refroidi pendant cinq jours, alors que l'injection du même tissu, mais non refroidi, est sans effet.

Chez des chiens porteurs d'un petit estomac de Pavlov, FEITELBERGER constate que l'implantation de tissu traité par le froid provoque une augmentation de la sécrétion du suc gastrique avec une élévation parallèle de son activité peptique. L'expérience témoin pratiquée avec de la peau fraîche n'entraîne aucune modification de cet ordre.

Ces tests effectués par les auteurs russes et rapportés par DELANNOY (36) sont d'un emploi délicat dans la pratique courante. Le dosage de l'activité enzymatique parfois préconisé ne peut s'appliquer à des extraits rigoureusement préparés selon la technique de FILATOV (37), encore qu'une activité enzymatique ait été signalée récemment (REBIERE (38), COTTE (39)).

La nature inconnue des biostimulines, l'absence de critères d'activité aisément applicables nous ont incité à une analyse systématique des extraits placentaires .

En nous réservant, à l'occasion de l'étude de chacun d'eux, de préciser les motifs qui nous poussé à soupçonner leur présence, nous nous proposons d'étudier les constituants des extraits placentaires dans l'ordre suivant :

- constituants minéraux ,
- peptides ,
- glycoprotéides ,
- nucléoprotéides .

II - E T U D E A N A L Y T I Q U E

A - CONSTITUANTS MINERAUX

Seuls les éléments suivants furent dosés : sodium , potassium, calcium, magnésium, oligo éléments, chlore, phosphore .

1/ Sodium, potassium, calcium :

Sodium, potassium, calcium , furent dosés par photométrie d'émission avec alimentation du brûleur par le mélange air - acétylène, après étalonnage à l'aide de solutions contenant le mélange des trois ions à des concentrations diverses. Cette technique conduit à admettre les taux suivants : (tableau I)

I

	Extrait Placentaire Humain	Extrait Placentaire Bovin
Sodium g/1...	1,70	4,30
Potassium g/1...	1	0,95
Calcium g/1...	0,020	0,025

2/ Magnésium :

Pour le dosage de cet ion, nous avons utilisé la méthode de MASSON, BETOURNE et BOIZEAU (40) .

Cette technique ne nécessite pas l'élimination des ions

autres que le magnésium, présents dans la solution ; elle repose sur la propriété du jaune titane de former avec l'oxyde de magnésium en solution alcaline un composé rouge qui se prête à une mesure colorimétrique . Pour éviter la précipitation de l'oxyde de magnésium , on opère en présence d'alcool polyvinylique .

Extraits placentaires humain et bovin présentent une teneur très voisine en magnésium, comme le montre le tableau II .

II

	Extrait Placentaire Humain	Extrait Placentaire Bovin
Magnésium g/1...	0,012	0,014

3/ Oligo - éléments :

La recherche des oligo - éléments a été effectuée par voie spectrographique. Après minéralisation acide, la solution est étincelée à l'aide d'un dispositif de Rotrode, en arc intermittent 50 périodes par seconde .

Cet examen n'a permis de déceler ni cuivre, ni fer, ni zinc, dans les extraits placentaires humains comme dans les extraits placentaires bovins .

4/ Chlore :

Nous avons utilisé la technique de SCHALES (41) .

Par addition de sulfate mercurique , il y a formation de chlorure mercurique aux dépens des ions chlore d'une solution . En présence de diphényl-carbozone, le moindre excès de sulfate mercurique donne un complexe rose violacé .

De même que l'ion sodium, l'ion chlore est présent à un taux bien supérieur dans l'extrait placentaire bovin :

III

	Extrait Placentaire Humain	Extrait Placentaire Bovin
Chlore g/1.....	3,55	7,10

5/ Phosphore :

En dehors du phosphore directement dosable, nous avons recherché quelle quantité de phosphore combiné pouvait être démasquée par hydrolyse .

La libération du phosphore combiné est obtenue par la technique de DENIGES (42) .

Le dosage du phosphore total et du phosphore libre est réalisé par la technique de BRIGGS (43) .

Hydrolyse :

Elle est réalisée par un mélange d'acide sulfurique et d'acide nitrique à parties égales en milieu alcoolique .

L'hydrolyse est poursuivie jusqu'à décoloration de la prise d'essai ; à ce stade, on reprend par l'eau et, par ébullition , on réduit le volume de moitié afin d'hydrolyser les ions meta et pyro - phosphoriques ayant pris naissance en milieu sulfurique et non décelables par le réactif molybdique de BRIGGS .

Dosage :

La méthode est basée sur la réduction de l'acide phospho-molybdique par l'hydroquinone, donnant une coloration bleue. Dans le cas du phosphore, c'est l'extrait placentaire humain qui présente le taux le plus élevé (tableau IV) .

IV

	Extrait Placentaire Humain	Extrait Placentaire Bovin
Phosphore directement dosable g/l	0,21	0,125
Phosphore total g/l	0,23	0,155

Nos résultats rassemblés ci-dessous montrent que l'extrait placentaire humain est habituellement moins concentré, en ce qui concerne les ions minéraux, excepté dans le cas des phosphates.

V

		Extrait placentaire humain	Extrait placentaire bovin
Sodium	g/l	1,70	4,30
Potassium	"	1	0,95
Calcium	"	0,020	0,025
Magnésium	"	0,012	0,014
Chlore	"	3,55	7,10
Phosphore directement	) ").....	0,21	0,125
dosable	)		
Phosphore total	) ").....	0,23	0,155

B- PROTEIDES

Le mode de préparation des extraits placentaires ne permet guère de prévoir la persistance d'holoprotéides, ce que confirme l'absence de précipité aux réactifs usuels : acide trichloracétique, acide sulfosalicylique, et surtout l'absence de toute bande visible après coloration au bleu de bromophénol d'un diagramme d'électrophorèse sur papier obtenu à partir d'extrait placentaire concentré.

Le raisonnement qui nous a conduit à supposer l'absence d'holoprotéides ne peut s'appliquer globalement aux hétéroprotéides. Parmi ceux-ci, glycoprotéides et nucléoprotéides sont des substances qui résistent assez bien à la chaleur, ne précipitent pas lors de l'emploi des réactifs usuels et peuvent être mis en évidence par des procédés plus sensibles que l'électrophorèse classique.

Enfin, il est logique de prévoir la présence de produits de dégradation des protéides (peptides, acides aminés) sans qu'il soit évidemment possible d'indiquer la catégorie de protéides qui leur a donné naissance.

En allant des substances les plus simples aux plus complexes, nous allons envisager :

- les peptides,
- les glycoprotéides,
- les nucléoprotéides.

1 - PEPTIDES

Nous avons établi leur présence, sans chercher à les identifier, à l'aide des réactions suivantes : réaction de précipitation, réaction à la ninhydrine après séparation électrophorétique.

L'emploi d'acide phospho-tungstique à 5 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 2 N à raison de 1 ml pour 5 ml d'extrait placentaire produit un abondant précipité : cette réaction, toutefois, est loin d'apporter la preuve formelle de la présence des peptides : glycoprotéides et nucléoprotéides en particulier précipitent dans les mêmes conditions, comme nous aurons l'occasion de le rappeler plus loin.

a) étude électrophorétique :

L'électrophorèse, par contre, semble indiquer sans équivoque leur présence : à partir d'un extrait placentaire concentré au quart environ par évaporation sous vide sans dépasser 40° C, on réalise une électrophorèse dans les mêmes conditions que celles réalisées pour l'étude des protéines sériques.

Après migration, la bande est découpée longitudinalement en deux parties :

- une des demi-bandes ainsi obtenues est colorée par l'amido-schwartz ou le bleu de bromophénol, afin de confirmer l'absence de protéides.
- l'autre demi-bande est examinée en lumière de Wood, puis révélée par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,2 p. 100 dans l'acétone et chauffage quelques minutes à 100° C.

L'examen en lumière de Wood montre une traînée fluorescente à laquelle correspond, après révélation, une traînée violette, plus rapide que la fraction albumine d'un sérum humain pris comme témoin.

b) résultats :

Fluorescence, réaction positive à la ninhydrine, vitesse électrophorétique, constituent des arguments assez probants pour conclure à la présence des peptides dans les extraits placentaires.

2/ GLYCOPROTEIDES

Il est actuellement difficile de présenter une définition des glycoprotéides en raison du désaccord qui règne entre les différents auteurs quant aux propriétés et aux limites de ce groupe. Dans ces conditions, il semble qu'une des meilleures définitions soit celle d'ANSELME rapportée par FAURE (44), car elle indique bien le caractère essentiel de ces hétéroprotéides sans marquer les limites du groupe par des caractères trop restrictifs ... " corps composés de protéides ou de peptides ou de glucides, celui-ci contenant généralement une hexosamine ; on admet conventionnellement que les nucléoprotéides n'entrent pas dans ce groupe."

Pour l'étude des glycoprotéides des extraits placentaires, nous avons employé d'abord l'électrophorèse pour leur mise en évidence, puis nous avons, d'une part, exploré leur partie prosthétique par les procédés chimiques et chromatographiques, et, d'autre part, étudié la composition en amino-acides de leur partie protidique.

a) électrophorèse :

1 - Choix des techniques :

Les techniques proposées dans ce but diffèrent sur deux points principaux de celles classiquement utilisées pour les holoprotéides :

- pH auquel l'électrophorèse est conduite,
- coloration.

- pH :

On obtient des renseignements très intéressants après électrophorèse à pH 8,6 ou 8,9 et cette méthode permet la comparaison avec un tracé électrophorétique réalisé à partir d'holoprotéides sériques. Mais pour un groupe particulier de glycoprotéides, les séromucoides acides, caractérisés par leur haute teneur en hexoses et en acide sialique il convient d'opérer à pH acide (pH 3,9).

- Coloration :

Toutes les techniques proposées cherchent à mettre en évidence le groupement prosthétique. On peut citer : la réaction à la diphenyl amine de DREVON et DONIKIAN (45) ; elle ne semble mettre en évidence qu'un seul des constituants du groupement polyosidique : l'acide sialique. Aussi est-elle peu employée en raison de son manque d'universalité. La réaction au bleu de toluidine de LEITNER et KERBY (46) qui transforment les polyosides en dérivés polyaldéhydiques puis polyacides. En raison de sa complexité, cette réaction est rejetée par de nombreux auteurs.

C'est la méthode histologique de coloration des glycoprotéides décrite par Mac MANUS (47) et adaptée aux tracés électrophorétiques par KRAMM et KOLB (48) qui donne les meilleurs résultats tant par sa spécificité que par la standardisation possible du réactif (en particulier teneur en anhydride sulfureux), ce qui permet la reproductibilité des résultats.

Après ce bref rappel de quelques notions générales, nous allons maintenant indiquer les techniques suivies :

- technique de BISERTE (49), pour l'isolement des glycoprotéides,
- technique de KRAMM et KOLB pour la coloration des glycoprotéides.

Toutes ces opérations furent pratiquées simultanément sur nos extraits placentaires et sur un sérum humain normal pris à titre de témoin.

2 - Isolement des glycoprotéides :

A 2 ml de sérum, on ajoute 18 ml d'eau salée isotonique, puis, goutte à goutte, 15 ml d'acide perchlorique 1,8 M. On laisse en contact pendant 10 mn. Après agitation, on filtre sur papier Whatman n° 1. A 15 ml de filtrat, on ajoute 3 ml d'acide phospho-tungstique à 5 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 2 N. On centrifuge et lave le précipité une fois à l'acétone, et deux fois à l'éther. Le précipité obtenu est dissous dans 0,4 ml de tampon véronal-acide chlorhydrique à pH 8,9 (Véronal : 26 g., eau : 21 g. acide chlorhydrique N q.s.p. pH 8,9 mesuré à l'électrode de verre).

Isolement et concentration des glycoprotéides du sérum sont ainsi réalisés .L'absence d'holoprotéides évite le fractionnement préalable des extraits placentaires ; opérant sur une solution de pH voisin de la neutralité, il est alors possible de réaliser une concentration efficace par évaporation sous vide à 30° C et d'éviter les risques de dénaturation liés à la précipitation phospho-tungstique.

3 - Conduite de l'électrophorèse :

- électrophorèse à pH 8,9 :

Le tampon est un mélange de véronal et d'acide chlorhydrique, la formule est indiquée au paragraphe précédent. L'électrophorèse dure 8 à 9 h sous 125 v.

- électrophorèse à pH 3,9 (BISERTE (50)) :

Nous avons exactement suivi la technique préconisée par BISERTE. Le tampon est un mélange de pyridine et d'acide acétique.

Pyridine	30 ml
Acide acétique ...	100 ml
Eau q.s.p.	5.000 ml

Pour une bande de papier Schleicher et Schull de 30 cm de longueur, le dépôt de la substance à étudier se fait sur un trait de 3 cm de large.

L'électrophorèse dure 12 h sous 125 v.

4 - Coloration :- préparation du réactif :

Ainsi que le préconise BISERTE (51), nous avons adopté pour la coloration de nos bandes la formule de KRAMM et KOLB (52).

La préparation du réactif a lieu de la manière suivante :

- Mettre 1.500 ml d'eau distillée dans une fiole conique de 3 litres, ajouter 4,5 g. de fuschine basique et agiter pour dissoudre. Ajouter 9,6 g. de métabisulfite de potassium, mélanger et laisser reposer pendant 5 à 10 mn., puis ajouter 40 ml d'acide sulfurique 6 N, bien mélanger, boucher et laisser reposer une nuit. Essorer à la trompe à eau sur deux feuilles de papier Whatman n° 1 après avoir ajouté 3 g de charbon activé et laisser reposer pendant 45 s. Le temps total de filtration ne doit pas excéder 3 mn.

Pour le tirage du réactif :

- Prélever 10 ml du réactif, ajouter 20 ml d'eau distillée et 5 ml d'empois d'amidon, titrer l'anhydride sulfureux libre par une solution d'iode décinormale ; on obtient en millimoles la quantité d'anhydride sulfureux libre par la formule suivante.

$$\frac{5 \times N \text{ ml Iode } N/10}{10} = x \text{ millimoles d'anhydride sulfureux libre.}$$

Ce chiffre doit être compris entre 2,8 et 4,8 millimoles. Si le taux en anhydride sulfureux n'est pas suffisant, on peut l'augmenter par addition de métabisulfite de sodium, dans le cas contraire le taux peut-être abaissé par simple ventilation. Le rajustement ne peut être effectué que trois fois.

- conduite de la coloration :

Fixation des bandes à l'alcool pendant 5 mn. Passage de 2 mn dans un bain d'acide périodique à 0,5 p. 100 en solution aqueuse (ROMANI (53)).

Lavage à l'alcool à 70 p. 100 : deux lavages de 2 mn.

Séchage de la bande entre deux feuilles de papier filtre.

Passage de 15 mn dans le réactif de KRAMM et KOLB: 100 ml pour la coloration de trois bandes.

Rinçage de 5 mn dans trois bains successifs d'eau sulfitée : métabisulfite de potassium : 4 g - acide chlorhydrique pur : 10 ml - eau : 1.000 ml.

5 - Résultats :

Dans le cas du sérum, nous avons toujours retrouvé les différentes fractions signalées par les auteurs qui se sont occupés de l'étude des glycoprotéides sériques (RAYNAUD ; FINE ; PULS et ALBAUM... (54)), à savoir :

- dans le cas de l'électrophorèse à pH 8,9 :

3 bandes principales au niveau des $\alpha 1$, $\alpha 2$ et β globulines, 2 fractions mineures au niveau de la sérum albumine et des γ globulines.

- dans le cas de l'électrophorèse à pH 3,9 :

2 composants M1 (orosomucoïde) et M2 plus rapides que la sérum albumine et chargés négativement à ce pH. Le reste des protéides se sépare en quatre groupes assez peu distincts : albumine et 3 fractions globuliniques (HAVEZ (55)) .

Dans les mêmes conditions, l'étude des extraits placentaires est loin de fournir des renseignements aussi précis .

A pH 8.9, on constate la présence d'une traînée à peine visible au niveau des $\alpha 2$ et des β globulines.

A pH 3.9, le résultat est encore moins net et interdit toute conclusion valable .

Ce manque de netteté de nos résultats peut s'expliquer par une dénaturation partielle des glycoprotéides lors de la préparation de l'extrait, dénaturation que nous avons signalée lors de l'isolement des glycoprotéides selon la technique de BISERTE, et qui se traduisait à ce niveau par une mauvaise solubilisation du précipité, phospho - tungstique dans le tampon à pH 8,9.

La coloration des bandes électrophorétiques par la fuschine bisulfitee ne permet donc pas de préciser la nature des glycoprotéides présents dans les extraits placentaires, elle montre seulement leur existence. Avant d'envisager l'étude chromatographique des oses inclus dans le groupement prosthétique, nous avons confirmé leur présence par des réactions chimiques et ce sont ces réactions de mise en évidence et de dosage que nous allons maintenant indiquer .

Nous verrons ainsi successivement comment mettre en évidence :

Les substances glucidiques en général ,
 Les acides uroniques ,
 Les pentoses ,
 Les méthylpentoses ,
 Les hexoses ,
 Les osamines ,
 Les acides sialiques .

Puis nous consacrerons les derniers paragraphes à l'étude chromatographique qui nous a permis une séparation au sein des groupes essentiels :

Aldohexoses,
Aldopentoses,
Hexosamines,
Acides sialiques.

Enfin, ces techniques chromatographiques nous ayant mis en présence de substances définies par leur seule fluorescence en lumière ultra-violette, nous préciserons, en terminant, les conditions de leur apparition.

b) Caractérisation des oses :

1/ Réactions chimiques applicables à la détection et au dosage des oses :

- Réaction de Molisch (technique de Dische (56)) :

A 1 ml de la solution inconnue, on ajoute 9 ml d'acide sulfurique dilué (acide sulfurique d = 1,84 dilué au 1/2) ; on mélange en évitant tout échauffement, on porte alors 3 mn au bain-marie bouillant, on laisse refroidir et on ajoute 0,2 ml d'une solution d' α naphtol à 5 p. 100 dans l'alcool à 96°. En présence de glucides, il se forme une coloration rouge.

La positivité très nette de cette réaction pratiquée sur nos extraits nous a conduit à rechercher :

- Les acides uroniques :

Réaction de Dische (57) : 1 ml de la solution à analyser est mélangé sans échauffement à 6 ml d'acide sulfurique concentré et chauffé pendant 20 mn au bain-marie bouillant ; après retour du mélange à la température du laboratoire on ajoute 0,2 ml d'une solution de carbazol à 0,1 p.100 dans l'alcool absolu .

La réaction est positive mais elle s'applique aussi aux hexoses et nous avons jugé utile de mettre en oeuvre la réaction de Tollens, plus spécifique.

Réaction de Tollens (technique de Maugham et Coll. (58)). 2 ml de la solution à analyser sont mélangés à 2 ml d'une solution aqueuse de naphto-résorcinol à 0,2 p. 100 et 2 ml d'acide chlorhydrique concentré. On chauffe au bain-marie bouillant pendant 30 mn exactement. On arrête la réaction par immersion des tubes, pendant 5 à 10 mn, dans la glace fondante.

On ajoute alors de l'éther ou de l'alcool amylique dans lequel passe le chromophore rose qui s'est développé : le résultat a été

cette fois négatif.

- Pentoses :

Réaction de Bial (technique de Dische et Schwarz (59)). A 1 ml de la solution, on ajoute 5 ml d'une solution de perchlorure de fer à 0,05 p. 100 dans l'acide chlorhydrique concentré, et 0,4 ml d'orcinol en solution alcoolique à 10 p. 100. On porte pendant 3 mn à 80° C, il se développe une coloration bleu vert en présence de pentoses.

Réaction de Dische (60). Le réactif est obtenu en ajoutant 2,75 ml d'acide sulfurique concentré (d = 1,84) à 100 ml d'une solution à 1 p. 100 de diphényl-amine dans l'acide acétique.

2 ml de ce réactif sont ajoutés à 1 ml de la solution à étudier ; après quelques minutes au bain-marie bouillant, une coloration bleu violacé indique une réaction positive.

Les réactions de Bial et de Dische sont fortement positives et peuvent être effectuées quantitativement mais elles ne sont pas absolument spécifiques : les acides sialiques, en particulier, sont mis en évidence selon le même mode opératoire. Cette catégorie d'oses fera l'objet d'une étude particulière, mais il nous paraît opportun de signaler ici leur présence dans les extraits placentaires pour expliquer l'impossibilité de doser les pentoses à l'aide des techniques précitées.

- Méthyl-pentoses :

Après une étude critique des différentes méthodes de dosage des méthyl-pentoses, WINZLER (61) estime que seule la réaction à la cystéine de DISCHE et SHETTLES (62) convient à leur dosage et à condition que celle-ci soit appliquée à une solution pure de glycoprotéide obtenue par électrophorèse, car la réaction proprement dite est précédée d'un chauffage en milieu sulfurique concentré. Nous n'avons pu appliquer cette méthode à nos extraits placentaires.

Pour les catégories de substances qui restent à envisager : hexoses, osamines, acides sialiques, de nombreux corps sont également gênants, mais le dosage reste néanmoins possible par spectrophotométrie.

- Hexoses :

Toutes les techniques utilisées reposent sur la détermination colorimétrique du produit de réaction des hexoses en présence d'acide sulfurique avec l'orcinol, le carbazol, l'anthrone, le tryptophane (WINZLER (63)).

La réaction à l'anthrone nous a paru la plus appropriée dans le cas des extraits placentaires parce qu'elle possède moins d'interférences avec les pentoses que l'orcinol, et moins d'interférences

avec les acides aminés que le carbazol.

Nous l'avons pratiquée selon la technique de GOA (64) : 2 ml d'extrait placentaire sont précipités par 0,4 ml d'acide phosphotungstique à 5 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 2 N.

Le précipité centrifugé est lavé très soigneusement par 5ml d'alcool éthylique à 95° .

Après centrifugation, le précipité est dissous dans une goutte de soude 5 N, on ajoute alors 2 ml d'eau distillée.

Les tubes sont placés dans un bain de glace et on ajoute ensuite, goutte à goutte, avec agitation constante, 4 ml de réactif à l'anthrone (0,2 g d'anthrone pour 100 ml d'acide sulfurique pur à 95 p. 100). Aucune coloration verte ne doit se développer. Les tubes à centrifuger sont placés dans un bain-marie à 92° C $\pm$ 0,5 pendant 7 mn ($\pm$ 30 s), puis déposés dans un bain de glace pendant quelques minutes. Après un repos de 15 mn à la température du laboratoire, la coloration est mesurée à 620 m μ parallèlement à un témoin contenant 2 ml d'eau distillée et 4 ml de réactif à l'anthrone, traité de manière identique aux tubes de dosage. Simultanément, on dose 2 solutions témoins contenant 25 et 30 microgrammes d'une solution équimoléculaire de galactose et de mannose.

Nous avons effectué la réaction telle qu'elle vient d'être décrite et directement sur 2 ml d'extrait placentaire après addition d'une goutte de soude pour être dans les mêmes conditions.

Les résultats exprimés en galactose-mannose sont les suivants dans le cas de l'extrait placentaire :

	<u>humain</u>	<u>bovin</u>
Extrait total	0,163 g/l	0,27 g/l
Fraction précipitable par l'acide phospho-tungstique	0,10 g/l	0,15 g/l

- Hexosamines :

La mise en évidence et le dosage des osamines se fait par la réaction d'ELSON et MORGAN (65), en opérant quantitativement pour le dosage.

Il est nécessaire de libérer les osamines dans un premier temps et nous avons opéré ainsi que le préconise MONTREUIL (66) : une hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 8 h à 100° C. Le mode opératoire a été le suivant :

5 ml d'extrait sont précipités par l'acide phosphotungstique dans le tube même qui servira à l'hydrolyse, afin d'éviter toute perte. Après élimination du surnagement, on ajoute 2,5 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Le tube est alors scellé à la flamme et on hydrolyse pendant 8 h à 100° C .

Après refroidissement, l'hydrolysate et les eaux de lavage de l'ampoule sont neutralisés. On complète alors à 15 ml et on opère la réaction sur 3 ml. Pour la réaction elle-même, nous avons utilisé la technique d'ELSON et MORGAN, en laissant, toutefois, la coloration se développer à 37° C comme le préconise SONNET (67) et non 75° C ainsi qu'il est indiqué dans la technique de MONTREUIL (68).

Dans les tubes jaugés à 15 ml, on introduit 3 ml de la solution d'osamines, 1 ml d'une solution d'acétylacétone à 3 p. 100, dans une solution de carbonate de soude 1,25 N, on porte au bain-marie à 100° C pendant 10 mn. Après refroidissement à la température du laboratoire, on ajoute 7 ml d'éthanol absolu, puis 1 ml de réactif d'Ehrlich (para-diméthyl-amino-benzaldehyde 1,6 g, acide chlorhydrique pur concentré 30 ml). Après contact 30 mn à 37° C, on complète à 15 ml par de l'éthanol absolu ; on laisse alors la réaction se poursuivre 30 mn à la température du laboratoire et à l'obscurité, puis on effectue la lecture à 510m μ . Les résultats exprimés en hexosamine sont les suivants : extrait placentaire humain : 0,08g/l ; extrait placentaire bovin : 0,10 g/l.

- Acides sialiques :

Nous aborderons ici seulement les problèmes que pose l'évaluation quantitative des acides sialiques, c'est en étudiant, plus loin, leur identification par chromatographie que nous rappellerons l'origine et la nature de ces substances.

Les réactions de mise en évidence et de dosage des acides sialiques peuvent se classer en deux groupes :

Méthodes directement applicables à une solution de glycoprotéides : réaction à la diphényl-amine de Dische (technique de AYALA (69)), réaction d'Ehrlich à la para-diméthyl-amino-benzaldehyde (technique de WERNER et ODIN (70)), réaction à l'orcinol de Bial, (technique de BLIX (71)), réaction au résorcinol de SVENNERHOLM (72).

Méthode applicable seulement aux acides sialiques libres : réaction à l'acide thiobarbiturique de WARREN (73).

Dans le premier groupe de techniques, hydrolyse et formation du chromophore sont réalisées en une seule opération, mais un manque de spécificité et une faible sensibilité contrebalancent fâcheusement cette simplicité. A l'inverse, il est possible d'effectuer la réaction de WARREN après une hydrolyse ménagée capable de libérer l'acide sialique sans le détruire et d'obtenir, par des conditions contrôlées d'oxydation périodique, un chromophore spécifique des 2 céto 3 désoxy 5 amino oses.

Les acides sialiques sont des 2 céto 3 désoxy oses où l'hydroxyle en 5 est remplacé par un groupe amine substituée ; la présence de substituant sur la fonction amine nécessite une oxydation périodique en milieu acide fort pour l'obtention d'acide formyl pyruvique dans les mêmes conditions opératoires les 2 désoxy oses fournissent du malonaldehyde : ces deux dérivés d'oxydation peuvent se combiner à l'acide thiobarbiturique avec formation d'un chromophore stable dont

le maximum d'absorption se situe à 549 m μ pour celui obtenu à partir d'acide sialique et à 532 m μ pour celui des 2 désoxy oses.

Nous avons successivement employé la réaction à la para-diméthyl-amino-benzaldéhyde, la réaction à la diphenyl-amine, puis la réaction à l'acide thiobarbiturique. Dans ce dernier cas, la réaction était pratiquée directement et après hydrolyse d'extraits placentaires selon la technique de WARREN, ou par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 pendant 5 mn à 90° C, en incluant dans la réaction un témoin acide lactaminique-lactose qui nous avait été aimablement fourni par le Docteur COLOBERT que nous tenons à remercier ici. La lecture à différentes longueurs d'ondes ne permettait guère de soupçonner la présence de désoxy-ribose, nous avons toutefois effectué, à titre de vérification, la réaction de WARAVEDKAR (74) ; celle-ci, spécifique du 2 désoxyribose, diffère essentiellement de la réaction de WARREN par une oxydation en milieu acide faible, par l'obtention d'un chromophore absorbant à 532 m μ et pouvant se prêter à une lecture spectrophotométrique sans extraction par la cyclo-hexanone. La réaction était effectuée directement et après hydrolyse par l'acide trichloracétique à 5 p. 100 pendant 5 mn à 90° C, ces conditions d'hydrolyse étant théoriquement les mieux adaptées à la libération sans destruction du 2-désoxyribose.

Les acides sialiques sont des corps relativement labiles, leur présence témoigne d'une certaine intégrité des glycoprotéides ou de leurs fragments d'hydrolyse ; la vérification de leur présence nous a donc paru d'un intérêt certain et, pour éviter tout apport par les glycoprotéides sériques, nous avons préparé un certain nombre d'extraits placentaires après lavage d'un broyat jusqu'à obtention d'un culot de centrifugation blanchâtre témoignant de la disparition des hématies.

Réaction de WERNER et ODIN (75) :

A 10 ml de la solution à étudier, on ajoute 2 ml du réactif d'EHRlich modifié (5 g de para-diméthyl-amino-benzaldéhyde dans 100 ml d'acide chlorhydrique au 1/2).Après 30mn au bain-marie bouillant, une coloration violette traduit la présence d'acide sialique .

Cette réaction est positive dans le cas des extraits placentaires .

Réaction à la diphenyl-amine (technique de WINZLER (76)).

A 0,2 ml de sérum, on ajoute 4,8 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100 . (Le sérum est ici utilisé comme témoin de la réaction).

A 2,5 ml d'extrait placentaire, on ajoute 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100 .

Les deux tubes sont alors portés pendant 15 mn à 100°C,

après refroidissement on filtre ; puis, on ajoute à 2 ml de filtrat 4 ml du réactif à la diphényl-amine (diphényl-amine 1g, acide acétique 90ml, acide sulfurique 10ml), puis on porte pendant 30 mn à 100°C .

On fait, dans les mêmes conditions, un témoin sans diphényl-amine.

La lecture est effectuée à 530 m μ . Cette réaction elle aussi est positive avec les extraits placentaires.

Réaction de WARREN (77) :

Réactifs :

méta-periodate de sodium 0,2 M en solution dans l'acide phosphorique 9 M,

arsenite de sodium à 10 p. 100 dans une solution 0,5 M de sulfate de sodium dans l'acide sulfurique 0,1 N,

acide thiobarbiturique à 0,6 p. 100 dans une solution 0,5 M de sulfate de sodium.

Mode opératoire :

à une prise d'essai de 0,2 ml, on ajoute 0,1 ml de meta-periodate de sodium ; après contact de 20 mn à la température du laboratoire, on ajoute 1 ml de la solution d'arsenite et on agite jusqu'à disparition de la coloration brune. On ajoute 3 ml de solution d'acide thiobarbiturique et les tubes sont alors placés pendant 15 mn au bain-marie bouillant ; après refroidissement, la coloration est entraînée par un égal volume de cyclohexanone et la lecture effectuée à 549 m μ .

Réaction de WARAVEDKAR (78) :

Réactifs :

acide periodique 0.025 N dans l'acide sulfurique 0.125 N, arsenite de sodium à 2 % dans l'acide chlorhydrique 0,5 N, acide thiobarbiturique : 0,71 g d'acide thiobarbiturique sont dissous dans 90 ml d'eau en présence de 0.7 ml de soude 1 N .

Mode opératoire :

A 3.5 ml de solution, on ajoute 0.5 ml d'acide periodique, après contact de 20 mn à la température du laboratoire on ajoute 1 ml de solution d'arsenite . A 1 ml du mélange précédent, on ajoute 2 ml de solution d'acide thiobarbiturique et on porte pendant 20 mn au bain-marie bouillant . Après refroidissement, la coloration est lue à 532 m μ .

Résultats :

Comme le montrent les tableaux ci-après, le spectre

d'absorption présente un seul maximum à 549 m μ quelle que soit la réaction utilisée, on peut donc affirmer la présence d'acide sialique dans les extraits placentaires .

REACTION de WARREN

	522 m μ	539 m μ	549 m μ	562 m μ
Acide lactaminique - lactose	0,09	0,185	0,25	0,15
Réaction de WARREN directe :				
Extrait placentaire humain brut	0,10	0,13	0,13	0,06
Extrait placentaire bovin brut	0,14	0,25	0,30	0,15
Extrait placentaire humain purifié lot 1	0,04	0,04	0,04	0,04
Extrait placentaire humain purifié lot 2	0,04	0,04	0,04	0,04
Extrait placentaire humain purifié lot 3	0,04	0,04	0,04	0,04
Réaction de WARREN après hydrolyse :				
Extrait placentaire humain brut	0,14	0,235	0,245	0,12
Extrait placentaire bovin brut	0,18	0,38	0,48	0,24
Extrait placentaire humain purifié lot 1	0,10	0,20	0,26	0,13
Extrait placentaire humain purifié lot 2	0,09	0,165	0,21	0,11
Extrait placentaire humain purifié lot 3	0,085	0,175	0,225	0,12

REACTION DE WARREN
AVANT ET APRES HYDROLYSE
PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE

Longueurs d'onde	Extrait placentaire humain purifié lot 5	Extrait placentaire humain purifié hydrolysé lot 5
470	0,09	0,105
480	0,07	0,09
490	0,065	0,095
500	0,08	0,13
510	0,10	0,175
520	0,125	0,235
522	0,135	0,25
524	0,14	0,26
526	0,15	0,28
528	0,16	0,30
530	0,165	0,32
532	0,18	0,34
534	0,19	0,36
536	0,20	0,38
538	0,21	0,40
539	0,22	0,41
540	0,225	0,42
542	0,235	0,445
546	0,245	0,46
548	0,255	0,485
550	0,255	0,48
552	0,25	0,47
554	0,23	0,44
556	0,215	0,41
558	0,185	0,37
560	0,17	0,325
562	0,15	0,285
564	0,13	0,245
568	0,09	0,17
570	0,08	0,11
580	0,03	0,05

REACTION DE WARAVEDKAR APRES HYDROLYSE

PAR L'ACIDE TRICHLORACETIQUE A 5 p.100

PENDANT 5 mn A 90° C

Longueurs d'onde	Extrait placentaire humain purifié lot 6	Extrait placentaire humain purifié lot 7
470	0,10	0,07
475	0,08	0,06
480	0,05	0,055
485	0,045	0,055
490	0,05	0,06
500	0,05	0,07
505	0,06	0,08
510	0,08	0,10
515	0,085	0,12
522	0,10	0,17
525	0,11	0,195
530	0,14	0,22
535	0,15	0,24
540	0,20	0,24
545	0,23	0,22
550	0,22	0,19
555	0,17	0,12
560	0,12	0,09
565	0,06	0,04
570	0,04	0,03

2 / Généralités sur l'étude chromatographique des oses :

Après caractérisation chimique des groupes d'oses présents dans les extraits placentaires, nous avons identifié les oses d'un même groupe par chromatographie sur papier .

Il n'est pas possible d'indiquer une technique applicable à tous les oses . La concentration de l'acide et le temps d'hydrolyse sont conditionnés par la position des oses dans les molécules de glycoprotéides ; la purification des hydrolysats et la révélation des chromatogrammes sont fonction de leur nature chimique .

Aldoses, osamines, acides sialiques seront envisagés séparément selon le plan suivant :

- Hydrolyse :

Discussion de la quantité d'extrait placentaire à mettre en oeuvre .

Choix de l'agent d'hydrolyse .

Purification des hydrolysats .

- Chromatographie proprement dite :

Systèmes solvants ,

Révélateurs .

Appareillage chromatographique : quelle que soit la catégorie d'oses étudiée, l'appareillage nécessaire au développement chromatographique est identique. Nous avons utilisé :

la chromatographie par écoulement continu, selon la technique de JERMYN et ISHERWOOD (79) ; la longueur de nos chromatogrammes était de 40 cm.

la chromatographie à développement radial selon la technique de POTTERAT (80) ; nos chromatogrammes avaient 25 cm de diamètre et nous avons utilisé la méthode avec évaporation .

Cette méthode est intéressante par le faible encombrement des cuves qui permet de réaliser facilement des conditions de température constante. En outre, elle permet la réalisation simultanée de 8 chromatogrammes et la comparaison des différents secteurs est aisée car si deux " spots " correspondent à une même substance, ils se joignent parfaitement au point de séparation des deux secteurs du chromatogramme .

3/ Etude chromatographique des aldoses :

a - Hydrolyse :

Quantité d'extrait placentaire à mettre en oeuvre :

l'hydrolyse s'effectue aux dépens du précipité obtenu par addition d'acide phospho-tungstique à l'extrait placentaire, le précipité est recueilli par centrifugation puis remis en suspension dans l'acide à la normalité choisie .

Comme l'a montré SONNET (81), ce mode opératoire présente un double avantage :

la précipitation élimine les glucides libres qui demeurent en solution et, par ailleurs les traces d'acide phosphotungstique retenues par le précipité contribuent à insolubiliser la plus grande partie des résidus protéiques libérés lors de l'hydrolyse .

Nous avons utilisé les précipités correspondant à 2 , 5, 10 ml d'extrait placentaire humain afin de déterminer la quantité optimum à mettre en oeuvre. Chaque précipité réalisé en double fut hydrolysé par 5 et 10 ml d'acide. Cette expérience effectuée à partir de différents lots d'extrait placentaire nous a montré qu'un résultat net et reproductible s'obtient quand on hydrolyse le précipité correspondant à 10 ml d'extrait placentaire humain par 5 ml d'acide. Dans le cas des extraits placentaires bovins, il suffit d'hydrolyser le précipité correspondant à 5 ml d'extrait placentaire par 5 ml d'acide .

L'étude des glycoprotéides sériques a montré que celles-ci renferment 100 à 120 mg de glucides pour 100 ml de sérum, soit 10 fois plus que les extraits placentaires. Or , pour leur étude chromatographique, SONNET a établi qu'il convenait d'hydrolyser 1 à 2 ml de sérum par 5 à 10 ml d'acide . Ce dernier résultat nous semble justifier le volume, en apparence très important, d'extrait placentaire à mettre en oeuvre .

L'emploi de quantités plus importantes conduit à des hydrolysats difficiles à purifier car trop riches en substances autres que les glucides ; au contraire, dans un hydrolysate trop peu concentré, il est difficile de mettre en évidence le fucose présent à un taux très bas par rapport aux autres glucides et partiellement masqué par le ribose, comme nous le verrons plus loin .

b - Température d'hydrolyse :

Habituellement, l'hydrolyse des glycoprotéides s'effectue à 100° C (MONTREUIL (82)), nous avons néanmoins effectué quelques essais à 120° C. Mais si cette technique permet une hydrolyse plus rapide, elle ne peut guère être employée en raison d'une destruction importante des oses libérés.

c - Choix de l'agent d'hydrolyse :

Comme l'ont montré GOTTSCALK et ADA (83), il ne semble pas exister de méthode quantitative d'hydrolyse, pas plus qu'il n'existe de méthode générale applicable à tous les glycoprotéides.

Ainsi s'explique la diversité des méthodes indiquées :

Echangeurs de cations en forme acide	:	DIXON (84),
Acide sulfurique 0,5 N, 5 h à 100° C	:	PARTRIDGE (85),
Acide sulfurique 2 N, 12 h à 100° C	:	YAMASHIMA (86),
Acide chlorhydrique N, 1 à 4 h à 100° C	(	MONTREUIL et
ou Acide chlorhydrique 2 N, 1 à 3 h à 100°C	:	SCHEPPLER (87).

La méthode de DIXON qui réalise à la fois l'hydrolyse et la fixation des produits de désintégration des protéines est peu intéressante du point de vue quantitatif ; les acides chlorhydriques et sulfuriques conduisent à des hydrolysats sensiblement identiques, il semble cependant que l'acide chlorhydrique favorise moins les condensations entre oses et acides aminés libérés au cours de l'hydrolyse que ne le fait l'acide sulfurique dans les mêmes conditions.

Une longue série d'essais nous a permis de constater que, dans le cas des extraits placentaires, les meilleurs résultats étaient obtenus avec :

l'acide chlorhydrique 0,5 N, 60 mn à 100° C,

l'acide sulfurique N, 60 mn à 100° C.

Quelle que soit la méthode employée, les différents auteurs sont d'accord pour admettre que l'hydrolyse est préférentielle. En général, le fucose (MONTREUIL (88) SONNET (89)) est libéré en premier alors que le galactose fait partie de la fraction la plus stable de la molécule.

Aussi, afin de réaliser une cinétique grossière de l'hydrolyse, nous avons fait agir l'acide chlorhydrique 0,1 N durant des temps progressifs de 15 mn, 30 mn, 45 mn, 60 mn.

d - Purification des hydrolysats :

Les hydrolysats renferment de nombreuses substances autres que les glucides et la séparation chromatographique de ceux-ci ne peut être réalisée sans purification préalable.

Il convient en particulier, de se débarrasser :

de l'agent hydrolyse,

des ions minéraux,

des produits de dégradation des protéides.

L'acide sulfurique est facilement éliminé sous forme de sulfate de baryum. On neutralise par la baryte sans dépasser un pH compris entre 6 et 6,5 car un pH alcalin provoquerait une dégradation notable des glucides. L'hydrolysate est alors concentré au 1/2 environ ; on opère sous vide sans dépasser 40° C ; lors de cette concentration, les résidus protéiques précipitent pour la plupart et peuvent être éliminés par simple centrifugation.

Dans le cas d'un hydrolysate chlorhydrique, l'acide peut être simplement éliminé par des évaporations répétées sous vide sans dépasser 40° C. Lors des deux premières évaporations, il est bon d'ajouter quelques millilitres d'eau lorsque l'hydrolysate est concentré aux 2/3 afin d'éviter une chute brutale du pH. La troisième concentration est poursuivie jusqu'à siccité ; il est alors facile d'extraire par 2 à 3 ml d'eau les oses libres du résidu d'évaporation qui est principalement constitué par les produits de dégradation des protéines.

Quel que soit le type d'hydrolyse, les opérations sont alors identiques ; elles ont pour but l'élimination des ions minéraux et des derniers résidus protéiques par passage sur résine échangeuse d'ions, selon le mode opératoire préconisé par MONTREUIL (90).

L'échangeur de cations (AMBERLITE I R 120 grains 25-30) est employé sous forme acide en colonnes de 10 mm x 100 mm, l'échangeur d'anions (AMBERLITE I R 4 B grains 25-50) sous forme acétate en colonnes de 10 mm x 100 mm.

La forme acide de l'échangeur de cations est obtenue par passage d'acide chlorhydrique 3 N (30 ml), puis lavage à l'eau distillée jusqu'à pH 6 - 6,5.

Pour l'échangeur d'anions, il convient d'éliminer toute forme OH qui provoquerait une dégradation importante des glucides et on arrive à ce résultat en l'utilisant sous forme acétate : passage de 50 ml d'acétate de sodium M/4, puis lavage avec 600 ml d'eau acétique à 1 p. 100.

Le liquide effluent et les eaux de lavage des résines sont concentrés sous vide sans dépasser 35° C, on termine la concentration dans un petit tube (tube à hémolyse par exemple), et le résidu repris par une quantité minimum d'eau est déposé sur le papier à chromatogramme.

e - Développement chromatographique :

Système des solvants : pour les oses, toutes nos chromatographies furent réalisées sur papier Whatman n° 1.

Quant aux solvants, nous avons d'abord utilisé le solvant de PARTRIDGE (91) : N butanol - acide acétique - eau = 4 - 1 - 5, puis le système solvant de BAAR et BULL (92) : N propanol - acétate d'éthyl - eau = 7 - 1 - 2, qui nous a semblé préférable car monophasique,

ce qui élimine partiellement l'influence des variations de température sur le développement chromatographique.

En chromatographie descendante, le temps de passage du solvant est de 48 h, en chromatographie circulaire, de 10 à 12 h.

Dans ces deux solvants, glucose et galactose ont le même Rf et leur identification définitive nécessite l'emploi du système solvant de JERMYN et ISHERWOOD (93) : pyridine - acétate d'éthyl - eau = 1 - 2 - 2, avec un temps de passage en chromatographie circulaire de 6 h.

Révélation des chromatogrammes : en présence d'un mélange inconnu d'oses, il est avantageux de pouvoir révéler sur un même chromatogramme les aldoses et les cétooses.

On arrive à ce résultat en pulvérisant sur le chromatogramme le réactif au phtalate d'aniline de PARTRIDGE qui met en évidence les aldoses, puis le réactif à l'urée chlorhydrique de DEDONDER qui fait apparaître les cétooses.

Le réactif de PARTRIDGE (94) a pour formule :

Aniline 0,93 g.

Acide phtalique 1,66 g.

Butanol saturé d'eau q.s.p. 100 ml

Après pulvérisation, on porte à l'étuve à 80° C pendant 5 à 10 mn ; les aldohexoses et les méthyl-aldopentoses apparaissent en brun, les aldopentoses en rose.

On pulvérise alors le réactif de DEDONDER (95) :

Urée 5 g.

Acide chlorhydrique 20 ml.

Ethanol 80 ml.

Après quelques minutes de chauffage à 100° C, les cétooses apparaissent sous forme de taches gris bleu virant au brun.

Nous avons également employé les réactifs au résorcinol ou au naphtoresorcinol en milieu acide qui permettent de distinguer, sur un même chromatogramme, acides uroniques, pentoses et méthyl-pentoses, céto-hexoses ; après plusieurs essais, nous avons adopté le révélateur de PARTRIDGE (96) qui s'obtient par mélange extemporané à parties égales de :

Solution alcoolique à 0,2 p. 100 de naphtoresorcinol,

Solution aqueuse à 20 p. 100 d'acide trichloracétique.

On le pulvérise sur le chromatogramme, on laisse sécher

à l'air, puis on place à 100° C pendant 5 à 10 mn.

Pour les aldoses également, de nombreux autres réactifs peuvent être employés ; lors de nos essais, nous avons utilisé, outre le réactif au phtalate d'aniline :

le réactif de BUCHAN et SAVAGE (97) :

Aniline en solution alcoolique à 4 p. 100	5 parties,
Diphényl-amine en solution alcoolique à 4 p. 100	5 parties,
Acide phosphorique sirupeux	1 partie.

Après pulvérisation, on chauffe pendant 5 mn à 100° C.

le réactif de JOHANSON (98) :

Anthrone	0,3 g.
Acide acétique	10 ml.
Ethanol absolu	20 ml.
Acide phosphorique (d = 1,60)	3 ml.
Eau	1 ml.

Après pulvérisation, on porte à l'étude à 108° C pendant 5 à 6 mn.

Entre nos mains, c'est le réactif de PARTRIDGE qui a donné les meilleurs résultats.

Pour terminer cet exposé des techniques de révélation, il nous paraît opportun de signaler ici que, préalablement à l'emploi de tout réactif, nos chromatogrammes étaient examinés en lumière de WOOD et nous indiquerons ultérieurement les renseignements apportés par cet examen.

f - Résultats :

Aldoses identifiabiles après hydrolyse acide :

Si l'on examine la composition des glycoprotéides, on constate que certains oses sont presque toujours présents, c'est ainsi que l'on a pu identifier :

Le galactose, le mannose, le fucose dans les séromucoïdes (WERNER (99) WERNER et ODIN (100)) .

Le galactose, le mannose, le fucose dans la thyroglobuline (GOTTSCHALK et ADA (101)) .

Le galactose, le glucose, le mannose, le fucose dans la substance de DONAGGIO (TAYEAU, BISERTE, MONTREUIL et MARQUE-VIELLE (102)) .

Le galactose, le mannose, le fucose, le xylose dans le mucoïde

d'ANDERSON et Mac LAGAN (BISERTE, TAYEAU, MONTREUIL , HOLLEMAN et DAUTREVAUX (103)).

Le galactose et le mannose dans l'haptoglobine (JAYLE (104)).

Le galactose et le mannose dans l'ovomucoïde (STACEY et WOOLEY (105)).

Le galactose et un méthyl-pentose dans la substance du groupe sanguin du meconium (RAPOPORT et BUCHANAN (106)).

Le galactose et le fucose dans la substance de groupe sanguin de la muqueuse gastrique de porc (KABAT, BENDICH et BEZER (107)).

Le galactose et le fucose dans le liquide de kyste de l'ovaire de femme (AMINOFF, MORGAN et WATKINS (108)).

Le galactose dans la substance du groupe sanguin de la salive (LANDSTEINER (109)).

Le mannose dans la fetuine (DEUTSCHE (110)).

Ce bref rappel analytique est loin d'être exhaustif. Il montre néanmoins que les oses le plus souvent rencontrés sont le galactose, le mannose, le fucose. Ce sont eux que nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence ; la présence de cétose ne pouvant être exclue à priori, nos chromatogrammes furent révélés au phtalate d'aniline et à l'urée chlorhydrique.

A partir d'un hydrolysât chlorhydrique réalisé dans les conditions précédemment définies et développé en butanol-acide acétique eau, seule la révélation au phtalate d'aniline s'avère positive. Le Rf des spots ainsi apparus permet de présumer qu'il s'agit :

de glucose ou de galactose, ces deux oses ayant même Rf dans le système solvant utilisé.

de mannose.

de fucose, toutefois la teinte du spot correspondant est légèrement différente du témoin fucose.

Nous avons alors définitivement caractérisé le mannose par emploi de témoin interne.

L'utilisation du système solvant de JERMYN et ISHERWOOD (111) nous a montré que c'était le galactose qui était présent dans les extraits placentaires. Nous avons confirmé le résultat par l'emploi de témoin interne comme pour le mannose.

L'identification de la troisième bande nous a posé un problème sérieux. Le réactif au naphto résorcinol peut révéler cette zone du chromatogramme, or il ne peut s'agir de cétooses, puisque la révélation par l'urée chlorhydrique est restée négative, ni d'acides uroniques du fait de la négativité de la réaction de TOLLENS ainsi que nous l'avons mentionné lors de l'étude analytique ; on peut en dé-

duire qu'il s'agit de pentose ou de méthyl-pentose.

Aucun des systèmes solvants employés (propanol-acétate d'éthyle - eau ; butanol - acide acétique - eau ; pyridine - acétate d'éthyle - eau ; acétate d'éthyle - acide acétique - eau) ne nous a permis d'obtenir cette bande à un niveau différent du fucose.

L'emploi du réactif au naphtorésorcinol nous avait néanmoins laissé supposer qu'elle était constituée de pentose ; par ailleurs, le réactif au phtalate d'aniline la faisait apparaître dans une teinte comprise entre le brun et le rose. Nous avons supposé qu'elle était constituée par un mélange de pentose et de méthyl-pentose.

Pour le vérifier, nous avons alors tenté d'effectuer une hydrolyse préférentielle. Ainsi que nous l'avons déjà indiqué, certains sucres, en raison de leur position terminale dans la molécule, sont libérés dès le début de l'hydrolyse ou peuvent être libérés seuls par une hydrolyse très douce.

Pour obtenir ce résultat, nous avons précipité 10 ml d'extrait placentaire par 2 ml d'acide phosphotungstique à 5 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 2 N. Le précipité recueilli par centrifugation est alors remis en suspension dans 10 ml d'eau distillée. Les traces d'acide incluses dans le précipité suffisent néanmoins à conférer à la suspension ainsi obtenue un pH bas (pH 4 - 4,5).

Après hydrolyse pendant 60 mn à 100° C, puis révélation dans ces conditions, il apparaît, au même niveau que le témoin fucose, une bande d'un rose très pur et que l'on peut considérer comme correspondant à un pentose.

Il n'existe pas de pentose possédant le même Rf que le fucose, mais certains auteurs ont signalé que des sucres de Rf différents pouvaient migrer ensemble lorsqu'ils étaient présents simultanément (GALANTI (112)). Au mélange étalon galactose-mannose, nous avons ajouté différents pentoses ; on retrouve toujours quatre spots identifiables par leur position et par leur teinte, excepté pour le mélange galactose-mannose-fucose-ribose ; galactose et mannose sont toujours bien individualisés mais on ne retrouve au niveau de l'étalon fucose qu'une bande de teinte intermédiaire entre le brun et le rose et semblable à la teinte que l'on obtient à partir des extraits placentaires.

Il nous paraît donc logique d'affirmer la présence des oses suivants : galactose, mannose, fucose, ribose.

On obtient les mêmes résultats en opérant sur l'extrait placentaire bovin.

- Cinétique de l'hydrolyse :

Pour obtenir une cinétique de l'hydrolyse, nous avons opéré dans les conditions déjà mentionnées, en milieu chlorhydrique 0. 1 N.

Nous avons opéré en chromatographie circulaire afin d'avoir une comparaison plus facile des résultats, en déposant sur les pistes restées libres un hydrolysate de référence réalisé par l'acide chlorhydrique N, et comme étalons : galactose, ribose, trehalose d'une part, et mannose, fucose, heptulose d'autre part.

Après 15 mn d'hydrolyse, le galactose, et plus faiblement le ribose, sont déjà visibles. Après 30 mn, ce résultat est pratiquement inchangé, le fucose commence à apparaître après 45 mn. Enfin, après 60 mn, on observe une bande très nette au niveau du galactose, des traces de mannose et une bande mixte de ribose, fucose. La bande de référence correspondant à l'extrait placentaire hydrolysé par l'acide chlorhydrique N montre évidemment ces mêmes sucres mais libérés en quantités plus importantes.

Nos étalons renfermaient du trehalose et de l'heptulose, afin de permettre le repérage d'éventuels polyosides.

SONNET (113) en effet, en appliquant une hydrolyse similaire aux glycoprotéides sanguines, a constaté l'apparition de polyosides ultérieurement dédoublés. Rien de tel ne se produit dans le cas des extraits placentaires.

- Aldoses directement identifiables :

Lors du chapitre consacré au dosage des aldoses, nous avons déjà signalé la présence d'oses dans la fraction non précipitable par l'acide phospho-tungstique : il ne pouvait donc s'agir que d'oses libres. A partir de différents lots d'extraits placentaires, nous avons concentré 10 ml déminéralisés au préalable, et il nous a été possible de mettre régulièrement en évidence du galactose et du mannose ; nous n'avons jamais pu mettre en évidence de ribose ou de fucose. Ceci s'explique peut-être par une moindre résistance de ces pentoses lors de la préparation des extraits.

En résumé, l'hydrolyse acide suivie de chromatographie sur papier montre la présence d'oses simples et l'absence de polyosides. En fonction de leur rapidité d'apparition, on met successivement en évidence : le galactose, le ribose, le fucose, le mannose.

4/ Etude chromatographique des osamines :

Les hydrolyses ont ici porté sur le précipité obtenu par addition d'acide phospho-tungstique comme dans le cas des oses, mais la nature chimique des osamines nécessite un mode opératoire très différent lors des opérations ultérieures.

a - technique :

La faible teneur des extraits placentaires en osamines exige une prise d'essai plus importante : 20 ml d'extrait placentaire humain ou 10 ml d'extrait placentaire bovin.

La stabilité très grande des liaisons qui unissent les osamines au reste de la molécule requiert une hydrolyse plus poussée : acide chlorhydrique 2 N pendant 120 mn à 100° C.

Leur groupement fonctionnel entraîne leur fixation sur l'échangeur de cations et il est nécessaire de les éluer par l'acide chlorhydrique 0,3 N (10 ml pour une colonne de 10 mm x 100 mm).

Leur séparation n'est possible que par l'emploi de solvants alcalins, en particulier le solvant de FISCHER et NEBEL (114) : pyridine - acétate d'éthyle - acide acétique - eau (5 - 5 - 31 - 1).

Les réactifs des oses ne révèlent pas leur emplacement et on doit employer un révélateur à base de paradiméthyl-amino-benzaldéhyde.

Nous avons utilisé le procédé de PARTRIDGE (115) modifié :

- pulvérisation de la solution suivante préparée extemporanément:

Acétyl acétone	1,5 ml
Solution aqueuse de carbonate de sodium à 170 g p. 1.000	50 ml
Séjour à l'étuve à 105° C pendant 5 mn, puis :	

- pulvérisation de la solution suivante :

Para-diméthyl-amino-benzaldéhyde	1 g.
Ethanol	30 ml.
Acide chlorhydrique concentré	30 ml.
N butanol	180 ml.

Après un séjour de 5 mn à l'étuve à 90° C, se développe une coloration rose violacé au niveau des osamines.

b - résultats :

On constate, après révélation, la présence de spots indiscutables, mais, en raison d'effets de traînée, il est difficile de préciser l'osamine en cause.

Pour pallier cet inconvénient qui est loin d'être particulier à l'étude des extraits placentaires, diverses techniques ont été proposées, on peut citer en particulier celle de GARDELL HEIJENSKOLD et ROCHNORLUND (116) qui transforment glucosamine et galactosamine en arabinose et en lyxose par désamination à chaud par la ninhydrine, puis identifient ultérieurement ces deux oses par les méthodes classiques. Dans le cas des extraits placentaires, nous n'avons pu employer cette méthode en raison de la quantité importante

de substances autres que les osamines entraînées lors de l'élution par l'acide chlorhydrique 0,3 N. Ces substances sont, en effet, fort gênantes lors de la désamination et, dans ces conditions, nous n'avons pu arriver à un résultat correct.

5/ Etude chromatographique des acides sialiques ;

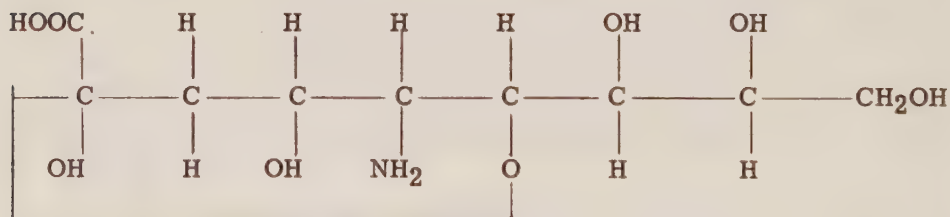
a - Introduction :

C'est BLIX (117) qui, le premier, attira l'attention sur une substance acide réductrice qu'il avait isolée de la mucine sous-maxillaire et pour laquelle il proposa le nom d'acide sialique.

Actuellement, ce terme s'applique à plusieurs substances de propriétés voisines qui entrent dans la composition de nombreux glycoprotéides.

Ces substances sont solubles dans l'eau et le méthanol; très labiles, en particulier en milieu acide et à chaud, elles donnent une réaction positive avec le réactif de Bial et le réactif d'Ehrlich, une réaction faiblement positive avec la ninhydrine (BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (118)).

Récemment, GOTTSCHALK et GRAHAM (119) ont pu établir, puis confirmer, par synthèse, la formule de base dont dérivent les différents acides sialiques.



Cette formule est celle de l'acide neuraminique et les acides sialiques en dérivent par adjonction de un ou plusieurs groupements acétyl ou glycolyl. SVENNERHOLM (120) a proposé d'adjoindre au terme acide sialique le nom du groupement substituant afin de les désigner.

Selon les espèces, on rencontre un ou plusieurs acides sialiques substitués.

Chez l'homme, on constate la présence exclusive d'acide N acétyl-sialique.

Dans l'espèce bovine, on rencontre, selon les glycoprotéides considérés, un mélange en différents pourcentages d'acide N acétyl sialique et d'acide N glycolyl sialique accompagnés ou non

d'acide di-acétyl-sialique et tri-acétyl-sialique (MARTENSON, RAAL et SVENNERHOLM, (121) GOTTSCHALK (122)).

La mise en évidence chromatographique des acides sialiques à partir des extraits placentaires nous a donc paru du plus haut intérêt car elle confirmait, d'une part, leur présence et, d'autre part, pouvait nous fournir un moyen simple de différenciation entre extraits placentaires humains et bovins.

La labilité très marquée des acides sialiques implique leur libération par des hydrolyses très douces ; leur obtention dans ces conditions reste néanmoins possible en raison de leur position externe dans les molécules de glycoprotéides et de la fragilité de la liaison glucosidique.

Afin de justifier notre technique d'hydrolyse, nous allons indiquer la méthode employée par BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (123) pour l'étude de l'acide sialique des mucines et celle de MARTENSON, RAAL et SVENNERHOLM (124) dans le cas des glycoprotéides sériques.

Méthode de BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER :

La mucine obtenue par extraction en milieu acide à partir des tissus, puis purifiée par précipitation et lavage, est mise en suspension dans 10 fois son poids d'eau distillée, elle est alors chauffée pendant 30 mn avec agitation constante, puis portée pendant 30mn au bain-marie en agitant fréquemment. Après refroidissement, on centrifuge et le culot est lavé par 200 ml d'eau. Le liquide surnageant et les eaux de lavage sont lyophilisés. L'acide sialique est alors extrait du résidu lyophilisé par l'alcool méthylique.

Méthode de MARTENSSON, RAAL et SVENNERHOLM :

Les protéines sériques sont coagulées par 4 volumes d'éthanol portés à 100° C pendant 30 mn, puis laissées en contact avec l'acide sulfurique 0,01 N pendant 24 h à + 40° C.

Le lavage est ensuite poursuivi avec l'acide sulfurique 0,01 N jusqu'à pH 2,5.

On hydrolyse ensuite ces protéines par l'acide sulfurique 0,01 N pendant 60 mn à 80° C.

b - Hydrolyse :

Discussion de la quantité d'extrait placentaire à mettre en oeuvre. Choix de l'acide.- Des dosages effectués comparativement avec les protéines sériques, il ressort que la teneur des extraits placentaires en acides sialiques est assez faible. Il est nécessaire d'opérer sur 20 ml d'extrait placentaire humain ou sur 10 ml d'extrait placentaire bovin pour obtenir un résultat net et reproductible.

Ces quantités sont précipitées par l'acide phosphotungstique puis lavées 3 fois par 5 ml d'eau distillée. Les précipités sont remis en suspension soit dans 10 ml d'acide sulfurique 0,01N et chauffés pendant 60 mn à 80° C, soit dans 10 ml d'eau distillée et soumis à l'autolyse pendant 60 mn à 100° C.

Nous avons tenu en même temps à effectuer certains essais en l'absence d'acide phosphotungstique qui peut apparaître comme un réactif particulièrement brutal : des volumes identiques furent soumis à l'autolyse à 100° C, ou à l'hydrolyse en présence de 2 ml d'acide sulfurique 0,1 N pour les extraits humains, et de 1 ml seulement pour les extraits bovins. Ce mode opératoire suit plus fidèlement les techniques citées mais conduit à des hydrolysats très difficiles à purifier.

Purification des hydrolysats : Après hydrolyse sulfurique, on amène le pH entre 6 et 6,5 par une solution de baryte, puis on évapore à 30° C sous vide. Dans le cas des autolysats, on se contente d'évaporer à 30° C. On peut alors purifier les hydrolysats par l'alcool méthylique, comme l'indiquent BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (125), mais il est préférable d'opérer cette purification par passage sur Dowex 50X 8 50 - 100 mesh (SVENNERHOLM (126)). L'effluent et les eaux de lavage sont alors évaporés sous vide sans dépasser 30° C.

c - Développement chromatographique :

Nous avons opéré une chromatographie descendante avec écoulement continu et selon la technique à développement radial dans les conditions décrites par SVENNERHOLM (127) qui préconise l'emploi du papier Whatman n° 1 et, pour la séparation des différents acides sialiques, le solvant butanol-propanol-acide chlorhydrique 0,1N (1 - 1 - 0,5).

La révélation s'effectue également dans les conditions établies par cet auteur :

Réactif au résorcinol,

Réactif d'Ehrlich.

Réactif au résorcinol :

Résorcinol	1	g.
Acide trichloracétique	15	g.
Eau	10	ml
Ethanol	10	ml
Sulfate de cuivre 0,1 M.....	0,2	ml
Butanol	60	ml

Réactif d'Ehrlich :

Para-diméthyl-amino-benzaldéhyde	0,5 g.
Acide trichloracétique	15 ml
Eau	10 ml
Ethanol	10 ml
Butanol	60 ml

Après pulvérisation de l'un de ces réactifs, les papiers sont séchés pendant 10 à 15 mn à 100° C, les taches violettes qui apparaissent dans ces conditions correspondent aux acides sialiques.

d - Résultats

Nous avons traité, dans les mêmes conditions que les extraits placentaires, des sérums humains et bovins afin de vérifier la valeur de nos techniques d'hydrolyse et de purification. En outre nous avons recherché les acides sialiques après simple concentration des extraits placentaires.

Dans le cas des glycoprotéides sériques, nos résultats sont semblables à ceux rapportés par MARTENSSON, RAAL et SVENNERHOLM : présence exclusive d'acide N acétyl sialique dans les glycoprotéides du sérum humain, présence d'acide N acétyl sialique et d'acide N glycolyl sialique dans les glycoprotéides du sérum bovin. L'emploi d'acides sialiques purs employés comme témoins nous a permis ultérieurement de confirmer ce résultat, et nous tenons à remercier ici le Docteur SVENNERHOLM qui a aimablement mis à notre disposition ces acides sialiques.

Dans le cas des extraits placentaires, on ne peut mettre en évidence que de l'acide N acétyl sialique quand bien même on opère à partir d'extrait placentaire bovin ; ce résultat reste inchangé quel que soit l'agent d'hydrolyse : l'autolyse à 100° C ne fait apparaître que des traces d'acide N acétyl sialique, par contre en modifiant la technique d'hydrolyse acide préconisée par SVENNERHOLM (augmentation de la température ou de la normalité de l'acide) on voit l'acide N acétyl sialique progressivement disparaître.

C'est vraisemblablement dans le procédé de préparation qu'il faut voir l'explication de cette absence, dans les extraits placentaires bovins, de l'acide N glycolyl sialique dont la grande fragilité est reconnue par BLIX, LINDBERG, ODIN et WERNER (128) et par GOTTSCHALK (129). La recherche des acides sialiques dans les extraits placentaires simplement concentrés s'est avérée négative; la grande fragilité de cet ose permet de supposer que, au cours de la préparation des extraits placentaires, les molécules libérées sont simultanément détruites.

6/ Etude des chromatogrammes en lumière de Wood .

Pour terminer, il nous paraît opportun de rapporter les résultats de l'étude des chromatogrammes en lumière de Wood, examen que nous avons pratiqué quelle que soit la catégorie d'oses à identifier.

Après purification par l'alcool méthylique comme après purification sur Dowex 50, les chromatogrammes effectués dans l'intention d'identifier les acides sialiques, examinés en lumière ultraviolette avant toute révélation, laissent apparaître plusieurs spots fluorescents dont l'un très net, juste en avant de l'acide N acétyl sialique, comme on le constate après révélation, une fois déterminé au crayon l'emplacement du spot fluorescent.

Les chromatogrammes destinés à l'identification des aldoses présentent ces mêmes spots si l'on se contente de purifier les hydrolysats par l'alcool méthylique, le phénomène n'apparaît plus après purification sur résines échangeuses d'ions .

Les chromatogrammes destinés à l'identification des osamines ne présentent jamais ce phénomène quel que soit le type de purification.

La nature de ces substances ne s'en trouve pas éclairée et on peut simplement conclure :

- au caractère acide de leur molécule : pas de fixation sur une résine échangeuse de cations, fixation sur une résine échangeuse d'anions,
- à une stabilité intermédiaire entre celle des acides sialiques et des aldoses : une hydrolyse en milieu chlorhydrique 0,5 N pendant 60 mn à 100° C n'entraîne pas leur disparition, mais cette stabilité est inférieure à celle des aldoses qui, eux, ne sont pas complètement détruits dans les conditions d'hydrolyse nécessaires à la libération des osamines (acide chlorhydrique 2 N pendant 120 mn à 100° C),
- à la fragilité de la liaison qui les unit au reste de la molécule où elles sont normalement incluses : libération possible dans les mêmes conditions très douces que celles nécessaires à la rupture de la liaison qui enchaîne les acides sialiques.

L'absence de révélation aux réactifs usuels ne nous a pas permis d'identifier ces zones fluorescentes et nous ne pouvons que nous borner à constater leur présence simultanée dans les extraits placentaires humains et bovins.

c) Etude chromatographique de la partie protéique :

A considérer la technique de préparation des extraits placentaires, on comprend la persistance de glycoprotéides plus ou moins altérés, et la dégradation des holoprotéides avec libération de peptides simples ou d'acides-amino lors du chauffage en milieu acide.

Si l'on veut étudier la constitution de la partie protéique des glycoprotéides par hydrolyse, et l'identification des acides-amino, il sera alors impossible de distinguer, au terme de l'hydrolyse, ce qui revient aux glycoprotéides et ce qui résulte seulement de la dégradation des holoprotéides primitifs. Tout au plus une comparaison des acides-amino décelables avant et après hydrolyse nous renseignera en partie sur les glycoprotéides.

Le mode opératoire est superposable dans son déroulement à celui employé pour la mise en évidence des oses :

Hydrolyse,
Purification,
Chromatographie bidimensionnelle,
Chromatographie à développement radial.

Hydrolyse :

La mise en évidence d'acides aminés libres peut être facilement réalisée. Il suffit pour cela de déposer quelques gouttes d'extrait placentaire sur une feuille de papier Whatman n° 1. Après séchage, on pulvérise une solution de ninhydrine ; une intense coloration violette apparaît par chauffage pendant quelques minutes entre 80 et 100° C.

Pour éliminer ces acides aminés libres, il nous a paru souhaitable de travailler sur le précipité phospho-tungstique comme dans le cas des oses ; la précipitation a lieu dans les mêmes conditions mais dans ce cas elle est suivie d'un lavage par l'acétone puis par l'éther. Le lavage à l'éther élimine les traces d'acide phospho-tungstique qui sont ici très gênantes.

Les quantités d'extrait placentaire à mettre en oeuvre, le titre de l'acide, et la durée de l'hydrolyse furent établis, comme dans le cas des oses, après une longue série d'essais.

En faisant varier le volume d'extrait de 1 ml à 5 ml, et en prolongeant l'hydrolyse de 15 à 90 mn en milieu chlorhydrique 0,5 N et N, nous avons retenu comme conditions les plus favorables à la mise en évidence des acides aminés celles d'une hydrolyse de 60 mn à 100° C en milieu 0,5 N, aux dépens de 2 ml d'extrait placentaire humain ou de 1 ml d'extrait placentaire bovin.

Purification des hydrolysats :

L'acide chlorhydrique est éliminé par des évaporations répétées sous vide sans dépasser 40° C, suivies de reprises par l'eau, en évitant de poursuivre l'évaporation jusqu'à siccité lors des deux premières évaporations.

On termine la purification par fixation des acides aminés sur résine Dowex 2, puis élution par l'acide acétique (AWAPARA SATO (130)). Le mode opératoire est le suivant :

La résine, sous sa forme hydroxyde, est lavée jusqu'à neutralité, puis disposée sur une hauteur de 3 cm dans une colonne de 1 cm de diamètre. Après passage de l'hydrolysate, la résine est lavée jusqu'à neutralité, puis les acides aminés sont élués par l'acide acétique 4 N jusqu'à obtention de 10 ml d'effluent. On se débarrasse ensuite de l'acide acétique par des évaporations sous vide, selon le procédé déjà appliqué à l'acide chlorhydrique.

Chromatographie bidimensionnelle :

Nous avons utilisé le système de WOIWOOD et LING-GOOD (131) qui emploient les solvants suivants :

	Solvant mobile	Saturation de l'atmosphère de la cuve par:
1ère dimension	Phénol saturé d'eau	Eau contenant 3 % d'ammoniaque
2ème dimension	Butanol-acide acétique-Eau (4 - 1 - 5)	Phase aqueuse séparée lors de la préparation du solvant.

La révélation des spots est opérée par emploi d'une solution à 0,2 p. 100 de ninhydrine dans l'acétone (TOENNIES, KOLB (132)), puis chauffage pendant quelques minutes entre 80 et 100° C.

Chromatographie à développement radial :

Si l'on considère la valeur des R_f selon le solvant, on constate que les constituants de certains groupes d'acides aminés se séparent assez mal dans les phases phénol-ammoniaque et butanol-acide acétique-eau ; c'est le cas du groupe des bases hexoniques (lysine, histidine, arginine), du groupe phényl alanine, leucine, méthionine, du groupe sérine, glycocolle.

Il faut donc compléter l'analyse par l'emploi d'autres systèmes solvants appropriés à la séparation d'un groupe particulier d'acides aminés au détriment de la séparation globale. Le procédé à une dimension convient alors parfaitement et, en permettant sur un même chromatogramme la comparaison du mélange à analyser et de témoins de substances pures, donne beaucoup de sûreté à l'interprétation

des résultats.

Nous avons adopté la technique de CHARTIER, KLAVERDEN, VAILLANCOURT (133). Les auteurs opèrent en chromatographie à développement radial à l'aide des systèmes solvants butanol acide formique - eau et lutidine - eau. En raison des grandes différences de Rf obtenues alors, nous avons jugé utile d'adopter deux temps de passage pour chaque solvant; à 20° pour des chromatogrammes de 25 cm de diamètre, ces temps sont :

9 h - 12 h pour le système butanol - acide formique - eau,

6 h - 12 h pour le système lutidine - eau.

Le tableau ci-après réunit les Rf des principaux acides aminés, tels que les indiquent CHARTIER, KLAVERDEN et VAILLANCOURT .

	N Butanol méthyl-éthyl- cétone NH ₃ 17 N 5 - 3 - 1	Butanol- acide formique- eau 75 - 0,8 - 24,2	Lutidine-eau 2 - 1
Cystéine	7	26	
Ac. glutamique	7	39	
Ac. aspartique		48	
Lysine			17
Arginine	12		25
Glycine			39
Hydroxyproline	15		
Histidine		76	
Alanine	20	50	
Sérine		38	
Tyrosine			65
Valine			44
Méthionine	28		51
Proline			
Thréonine	33	37	
Isoleucine		63	
Leucine	41	63	
Phényl alanine	46	53	

Nous avons également mentionné les Rf des acides aminés dans le système solvant butanol-méthyl-éthyl-cétone-ammoniacque ; ce système solvant étant préconisé par les auteurs pour l'analyse sommaire d'un mélange d'acides aminés.

Résultats :

Nous allons reporter ci-dessous les acides aminés mis en évidence après hydrolyse et les acides aminés libres. Dans ce cas, il suffit d'une simple déminéralisation de l'extrait placentaire pour arriver au résultat. Les extraits placentaires sont particulièrement riches en acides aminés libres : 0,5 ml d'extrait suffisent, en effet, et c'est là un résultat qui contraste particulièrement avec les quantités importantes nécessaires à la mise en évidence des autres constituants.

De même que lors de l'étude des oses, extraits placentaires humains et bovins fournissent les mêmes résultats.

Amino-acides directement identifiables

Cystine
Cystéine
Alanine
Hydroxy-proline
Glycocolle
Phényl alanine
Méthionine
Tyrosine

Amino-acides identifiables après hydrolyse

Cystéine
Alanine
Hydroxy-proline
Glycocolle
Phényl alanine
Acide aspartique
Méthionine

3 - NUCLEOPROTEIDES

La présence d'acides nucléiques dans les extraits placentaires a déjà été signalée : GATE et VACHON (133) rapportent que certains auteurs ont voulu en faire le support de l'activité biostimulante, en dépit des échecs constatés lors de l'emploi des nucléotides constitutifs de l'acide " zymonucléique ", en remplacement des extraits placentaires ; ils citent les résultats obtenus par COTTE et VALDIGUIE en photométrie d'absorption dans l'ultra-violet.

La solubilisation des acides nucléiques ne saurait surprendre. Les conditions de préparation assez brutales favorisent la libération de multiples constituants cytoplasmiques et nucléaires, en même temps qu'elles entraînent une dégradation marquée de la fraction protéique, ainsi que nous l'avons signalé lors de l'étude électrophorétique. Les acides nucléiques présentent une stabilité suffisamment marquée pour résister à ces conditions de préparation ; en effet, leur extraction à partir des tissus est possible :

- soit par l'acide trichloracétique à 5 p. 100, à chaud selon SCHNEIDER (134),
- soit par l'acide perchlorique, à froid, puis à chaud, selon OGUR et ROSEN (135).

La mise en évidence des acides nucléiques est généralement réalisée par spectrophotométrie ultra-violette. Les noyaux puriques et pyrimidiques sont responsables du maximum d'absorption constaté à 258-259 m μ , pour un acide nucléique en solution isotonique à pH 7. En vue d'un dépistage, on peut se contenter de la mise en évidence d'un pic d'absorption à la longueur d'onde précitée, mais lorsque d'autres substances absorbant la lumière ultra-violette sont présentes simultanément, le maximum d'absorption peut être déplacé ; l'emploi d'un témoin interne, ou le calcul des rapports de la densité optique maximale à la densité optique pour différentes longueurs d'onde, est alors nécessaire.

L'analyse spectrophotométrique ne peut suffire à affirmer la présence d'acides nucléiques, la mise en évidence du phosphore et surtout du ribose et du désoxyribose apporte une confirmation d'autant plus intéressante qu'elle permet d'éliminer l'interférence de molécules simples où serait engagé un noyau purique ou pyrimidique.

1/ Noyau purique :

Toutes nos déterminations furent réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre JOBIN & YVON, type Maroc, en cuves de quartz de 1 cm d'épaisseur, sur des solutions portées, après une série de déterminations préalables, à la dilution permettant d'utiliser l'appareil dans les meilleures conditions de sensibilité.

Après avoir effectué le spectre d'absorption d'un acide nucléique d'origine animale, nous avons étudié différents lots d'extraits placentaires, directement et après addition d'acide nucléique, puis d'albumine. Les mêmes opérations furent réalisées après hydrolyse par l'acide chlorhydrique N, pendant 60 mn à 100° C, selon la technique de CHARGRAFF et DAVIDSON (136).

Les spectres réalisés à partir de différents lots d'extraits placentaires humains et bovins sont superposables à celui de l'acide ribonucléique, tant par leur allure générale que par l'emplacement du maximum d'absorption. L'addition d'extrait placentaire à l'acide ribonucléique ne déplace nullement le pic primitivement constaté. Dans le mélange extrait-placentaire-albumine, on retrouve, d'une part, l'absorption propre à l'albumine, et, d'autre part, très légèrement déplacé, le maximum initialement constaté dans l'extrait placentaire pur. Le déplacement du maximum d'absorption après hydrolyse, tant pour l'extrait placentaire que pour l'acide ribonucléique témoin, confirme le comportement commun des deux solutions, comme le montrent les tableaux suivants.

	Ac. nucléique	Extr. placént. humain - lot 1	Extr. placént. bovin	Extr. placént. humain - lot 2	Extr. placént. humain - lot 3	Extr. placént. humain - lot 4	Extr. placént. bovin - 1 vol. Ac. nucléique	Extr. placént. humain - 1 vol. Ac. nucléique	Ac. nucléique	Extr. placént. humain - lot 1	Extr. placént. bovin hydrolysé	Extr. placént. humain hydro- lysé - lot 2	Extr. placént. humain hydro- lysé - lot 3	Extr. placént. humain hydro- lysé - lot 4
220	0,32	0,95	0,053	0,71	0,42	0,52	0,8	0,65	0,30	0,39	0,7	0,34	0,26	0,25
230	0,20	0,50	0,31	0,36	0,21	0,28	0,45	0,37	0,25	0,27	0,38	0,185	0,17	0,14
240	0,275	0,31	0,265	0,25	0,16	0,21	0,345	0,270	0,30	0,25	0,26	0,16	0,18	0,12
245	0,35	0,295	0,285	0,30	0,19	0,235	0,38	0,33	0,39	0,31	0,285	0,20	0,225	0,16
250	0,42	0,295	0,315	0,35	0,22	0,265	0,42	0,34	0,43	0,43	0,35	0,24	0,245	0,19
252	0,44	0,30	0,33	0,365	0,23	0,28	0,435	0,420	0,44	0,365	0,33	0,25	0,245	0,195
254	0,46	0,305	0,34	0,385	0,24	0,29	0,45	0,45	0,45	0,38	0,345	0,265	0,25	0,21
256	0,48	0,32	0,35	0,40	0,245	0,30	0,45	0,46	0,45	0,39	0,34	0,27	0,25	0,22
258	0,49	0,31	0,365	0,41	0,25	0,31	0,45	0,45	0,45	0,40	0,38	0,28	0,25	0,225
260	0,48	0,32	0,36	0,41	0,25	0,31	0,46	0,48	0,45	0,40	0,38	0,285	0,24	0,23
262	0,475	0,305	0,355	0,405	0,245	0,305	0,44	0,48	0,45	0,405	0,385	0,29	0,245	0,235
264	0,46	0,29	0,398	0,40	0,24	0,30	0,44	0,48	0,44	0,40	0,39	0,29	0,245	0,235
266	0,44	0,285	0,345	0,385	0,235	0,29	0,42	0,46	0,445	0,395	0,40	0,29	0,245	0,235
267	0,43	0,28	0,33	0,38	0,23	0,28	0,42	0,46	0,44	0,385	0,39	0,29	0,24	0,235
268	0,415	0,275	0,32	0,37	0,225	0,275	0,42	0,46	0,44	0,385	0,39	0,29	0,24	0,235
270	0,39	0,26	0,30	0,35	0,21	0,26	0,46	0,48	0,43	0,37	0,39	0,285	0,235	0,23
272	0,355	0,24	0,28	0,325	0,195	0,24	0,36	0,41	0,41	0,36	0,38	0,275	0,23	0,225
274	0,325	0,23	0,245	0,30	0,18	0,22	0,36	0,41	0,40	0,34	0,38	0,26	0,22	0,21
276	0,29	0,21	0,21	0,27	0,16	0,21	0,30	0,36	0,37	0,32	0,365	0,24	0,205	0,20
278	0,26	0,19	0,21	0,24	0,14	0,185	0,25	0,30	0,35	0,30	0,35	0,23	0,195	0,190
280	0,22	0,17	0,18	0,215	0,125	0,165	0,25	0,30	0,33	0,27	0,34	0,21	0,18	0,17
290	0,09	0,095	0,095	0,09	0,05	0,085			0,22	0,17	0,23	0,11	0,10	0,095
295	0,04	0,06	0,07	0,05	0,02	0,06			0,17	0,12	0,17	0,07	0,06	0,06
300	0,02	0,03	0,05	0,03	0,01	0,045			0,12	0,08	0,12	0,03	0,04	0,03

	Albumine	Extrait placentaire bovin - 1 vol. Albumine à 1 p. 1000 - 1 vol.	Extrait placentaire humain - 1 vol. Albumine à 1 p. 1000 - 1 vol.	Extrait placentaire bovin - 3,5 vol. Albumine à 1 p. 1000 - 0,5 vol.	Extrait placentaire humain - 3,5 vol. Albumine à 1 p. 1000 - 0,5 vol.
230	1,8	1,8	1,8	1,12	1
245	0,4	0,45	0,46	0,38	0,42
250	0,31	0,385	0,42	0,37	0,45
252	0,29	0,38	0,435	0,365	0,46
254	0,29	0,38	0,43	0,365	0,47
256	0,295	0,39	0,44	0,365	0,48
258	0,30	0,40	0,45	0,365	0,48
260	0,31	0,40	0,46	0,365	0,48
262	0,33	0,41	0,46	0,36	0,48
264	0,34	0,425	0,47	0,355	0,48
266	0,35	0,43	0,47	0,35	0,46
268	0,37	0,43	0,47	0,345	0,45
270	0,385	0,44	0,47	0,335	0,43
272	0,40	0,44	0,48	0,33	0,41
274	0,415	0,44	0,465	0,31	0,39
276	0,44	0,45	0,47	0,30	0,365
278	0,445	0,45	0,455	0,285	0,34
280	0,435	0,43	0,43	0,265	0,31
282	0,41	0,40	0,410	0,245	0,28
284	0,38	0,37	0,36	0,22	0,25
286	0,34	0,33	0,32	0,20	0,22
288	0,28	0,28	0,265	0,17	0,19
290	0,21	0,22	0,205	0,14	0,16
292	0,16	0,175	0,16	0,12	0,13
294	0,11	0,135	0,12	0,10	0,11
296	0,09	0,11	0,095		
298	0,07	0,09	0,09		
300	0,06	0,08	0,09	0,07	0,07

III - RECHERCHE DE PROPRIETES

ANTIGENIQUES

C'est au niveau du groupe des acides sialiques que, sur le plan strictement chimique, il est le plus aisé de constater une différence qualitative entre espèces animales ; les résultats de l'analyse que nous avons précédemment exposés montrent que cette différence n'apparaît plus dans le cas des extraits placentaires : les préparations placentaires, tant d'origine bovine que d'origine humaine, ne renferment en effet que de l'acide N acétyl sialique, alors que les glycoprotéides bovins contiennent, en outre, de l'acide Nglucolyl sialique à l'inverse des glycoprotéides humaines.

Il nous paraissait néanmoins intéressant de pouvoir différencier des préparations de diverses origines animales et nous avons eu recours aux techniques immunologiques dans ce but. Dans un premier temps, nous avons cherché à obtenir des immuns-sérums capables de détecter les antigènes tissulaires susceptibles d'avoir été solubilisés lors de la préparation des extraits placentaires ; puis, en raison de l'importance des constituants glycoprotéiques que ceux-ci renferment, nous avons tenté d'apprécier l'importance éventuelle des antigènes de groupe sanguin A, B, 0 au sein de cette fraction glycoprotéique. Nous rapporterons plus loin nos résultats, mais il convient de signaler, dès maintenant, que la constatation de certains phénomènes non spécifiques, dans la mise en évidence des substances de groupe sanguin, nous a conduit à étendre nos expériences à un certain nombre de préparations d'origine humaine ou animale destinées à la vie parentérale.

A - ANTIGENES TISSULAIRES

1/ Préparation des immuns sérums

En raison même de la technique d'obtention des extraits placentaires, dont nous savons le caractère dénaturant vis à vis des protéines, et surtout compte tenu de la disparition prévisible de toute protéine susceptible d'avoir conservé un caractère antigénique spécifique, nous avons, dans l'intention de préparer des immuns sérums, mélangé préalablement les extraits placentaires à des solutions protidiques capables de fournir un support aux haptènes éventuellement présents dans les extraits. Nous avons ainsi mélangé, à parties égales, chacun des extraits avec du sérum filtré de truie.

Ce sont ces mélanges à parties égales qui ont servi aux inoculations de lapins. Les lapins ont été injectés par voie sous-cutanée à doses constantes de 2 ml, répétées à des intervalles de trois à sept jours. Dix à quinze injections ont été ainsi effectuées, suivies, après un repos d'une semaine, d'une ponction cardiaque qui a permis d'obtenir un premier échantillon de sérum.

Cinq jours après cette ponction, une nouvelle série de cinq ou six injections a été entreprise, sur le même rythme que la première, et les animaux ont été saignés à blanc huit à dix jours après la dernière injection.

2/ Réactions mises en oeuvre

a) Hémagglutination conditionnée selon BOYDEN (138).

On sait que la surface de l'hématie peut fixer de nombreuses substances en solution ; une température de 37° C et un pH voisin de la neutralité suffisent en général à cette fixation dans le cas de substances glucidiques ; au contraire, les molécules protéiques ne peuvent être fixées que si la surface du globule rouge a préalablement

été modifiée par l'acide tannique en solution très diluée ; dans ce cas, il est parfois nécessaire d'opérer à 56° C et à pH acide. Lorsque la substance fixée sur les globules rouges est antigénique, le contact de telles hématies avec un immum sérum se traduit, en tubes à fond hémisphérique, par une sédimentation d'aspect différent de celle d'hématies non sensibilisées ; il n'y a pas agglutination au sens strict du mot, bien qu'on désigne par hémagglutination, une réaction positive.

b) Immunodiffusion :

OUCHTERLONY (139) a proposé d'effectuer les réactions classiques de précipitation de systèmes antigènes-anticorps en milieu gélosé, pour obtenir une meilleure séparation des divers complexes qui peuvent apparaître dans un mélange.

Les solutions d'antigène et d'anticorps sont déposées dans des cavités ménagées dans une plaque de gélose à 1 % en solution de chlorure de sodium isotonique : par diffusion, les constituants migrent à partir de chaque cavité et peuvent s'unir en formant un complexe insoluble. Le précipité ainsi apparu se situe sur une ligne qui dépend de la vitesse de diffusion et des différentes concentrations qui en résultent.

En outre, il devient possible de confronter dans une même opération, plusieurs systèmes, et de reconnaître par la continuité des arcs de précipitation, une parenté éventuelle entre eux.

3/ Résultats

Aucune de ces réactions ne s'est avérée positive même dans le cas des systèmes homologues : immum sérum-anti extrait placentaire humain contre extrait placentaire humain, immum sérum-anti extrait placentaire bovin contre extrait placentaire bovin.

Les précautions techniques que nous avons jugé utile de prendre lors de la préparation des sérums n'ont donc pas suffi à distinguer les motifs antigéniques des sous-unités protéiques présentes dans les extraits placentaires : nous avons admis que les procédés d'immunisation ne pouvaient aboutir à la distinction des extraits placentaires humains et bovins en raison de la dénaturation des antigènes susceptibles d'être ainsi révélés.

Par contre, les substances responsables de la spécificité de groupe sanguin dans le système A, B, O sont stables en particulier à la chaleur (MORGAN et KING (140)) et semblables mais non identiques selon les espèces considérées (BEISER et KABAT , (141)) ; enfin si leur mise en évidence par les procédés d'immunisation est particulièrement ardue en dehors de l'espèce humaine (BENDICH (142)), il est par contre aisé de mettre en évidence les groupements chimiques, même partiellement dégradés, responsables de leur spécificité grâce au pouvoir inhibiteur que ceux-ci présentent

vis à vis d'un immun sérum (SPRINGER et Coll. (143)).

Elles semblaient à priori devoir ainsi nous livrer des moyens plus aisés d'identification spécifique, pour laquelle des techniques précédemment employées s'étaient avérées impuissantes.

La complexité toujours croissante des acquisitions concernant ces substances, la finesse des distinctions qu'elles permettent d'établir, et enfin leur rôle dans un domaine important de la pathologie nous ont poussé d'une part à en exposer la structure en détail, d'autre part à étendre nos essais aux autres médicaments injectables susceptibles de les recéler.

B - ANTIGENES DU SYSTEME A, B, O.

1/ Généralités

L'usage a consacré l'emploi du terme " groupe sanguin " pour désigner les éléments du système ABO, bien que ce terme soit trop restrictif ; en effet, les substances responsables de la spécificité mise en évidence par diverses épreuves sérologiques ne se retrouvent pas seulement au niveau des hématies, leucocytes et plaquettes, mais pratiquement dans tout l'organisme, comme le montrent les travaux effectués par FRIEDENREICH et HARTMANN (144) à l'aide de la technique d'inhibition de l'hémagglutination appliquée à des extraits aqueux obtenus à chaud à partir de divers organes d'individus tant sécréteurs que non sécréteurs (on désigne par sécréteurs, des individus chez qui on peut mettre en évidence une spécificité de groupe A et B, non seulement à la surface des hématies, mais aussi dans certaines sécrétions, en particulier la salive) ; on peut, selon ces auteurs, classer les organes de la manière suivante : estomac, glandes sous-maxillaires, pancréas, vésicule biliaire, rein, parotide, foie, épидидyme, prostate, poumon, etc..., hématies, l'estomac étant l'organe le plus actif et les hématies paraissant dépourvues de toute activité dans les conditions opératoires d'extractions définies par les auteurs. Le suc gastrique, la salive, la bile, en corollaire, sont très riches en substance de groupe, chez les sécréteurs du moins, car chez les non sécréteurs, ces mêmes substances sont à un taux faible dans le suc gastrique et à un taux pratiquement nul dans la salive et

dans la bile qui, par contre, sont riches en substances Le^a .

L'emploi de sérum marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine a permis à GLYNN et HOLBOROW (145) de confirmer et de préciser les études antérieures. Au niveau de l'estomac et du pylore, on a la répartition suivante :

	Secréteurs	non sécréteurs
Cellules superficielles de la couche muqueuse :	$\text{A}_1\text{B} \quad ++$	$\text{A}_1\text{B} \quad -$
	$\text{H} \quad ++$	$\text{H} \quad ++$
	$\text{Le}^a \quad +/ -$	$\text{Le}^a \quad ++$
Cellules profondes :	$\text{A}_1\text{B} \quad +$	$\text{A}_1\text{B} \quad +$
	$\text{H} \quad +/ -$	$\text{H} \quad +/ -$
	$\text{Le}^a \quad -$	$\text{Le}^a \quad -$

Ces recherches montrent :

- que la source principale de substances de groupe sanguin est constituée par les cellules des glandes muqueuses qui déversent continuellement leurs produits dans les sécrétions telles que suc gastrique, salive, bile, etc...

- que le terme " non sécréteurs " est inadéquat car tous les individus sécrètent une substance mucoïde : A, B, H ou Le^a .

Enfin, il est possible, chez certains individus extrêmement rares, de mettre en évidence les substances de groupe sanguin dans les sécrétions mais non à la surface des hématies.

Dans le système A, B, O, la nature chimique des déterminants antigéniques n'est pas rigoureusement comparable au niveau des sécrétions et au niveau des globules rouges, c'est ce qui explique le peu d'activité d'extraits globulaires, préparés selon les conditions d'extraction de FRIENDERECH et HARTMAN ; en outre, les déterminants A, B, H des hématies paraissent appartenir à des substances entrant dans la structure du globule lui-même, et non apportées de l'extérieur ; au contraire, dans le système Lewis dont nous avons déjà mentionné les rapports avec le système A, B, O, les substances présentes dans les sécrétions et à la surface des hématies seraient identiques ; au niveau de l'hématie, il semble qu'il y ait une simple absorption de substances spécifiques comme le montre la transformation d'hématies Le^{a-} en Le^{a+} , après le contact, tant in vitro qu'in vivo, avec le sérum d'un individu dont les hématies sont Le^{a+} .

Les études chimiques ont montré que le caractère spécifique des substances de groupe A, B, H Lewis était lié à des muco-polysaccharides et on peut actuellement concevoir la relation A, B, H Lewis et les étapes de biosynthèse, caractérisées par l'addition successive des oses responsables de la spécificité, au moins dans le cas des cellules muqueuses, selon le schéma suivant :

MUCOPOLYSACCHARIDE DE BASE (M P S)
(inspiré de MOULLEC (146)

M P S

Le				le le		Gènes	Oses ajoutés par le gène: unités fucose		
Le ^a				M P S		Substance résultant de l'action du gène			
Se se se se				Se		Gènes			
H (Le ^a) (Interaction H Le ^a Le ^b)				H		M P S	Substance résultant de l'action du gène	Se, par addition d'unités fucose, peut transformer en substance H, le MPS qu'il ait ou non subi l'action du gène Le	
A	B	O	ABO	A	B	O	ABO		Gènes
A (H) (Interaction H—Le ^a —Le ^b)	B (H)	H	Le ^a	A (H)	B (H)	H	M P S		Substance résultant de l'action du gène
A ^H ,Le ^a ,Le ^b B ^H ,Le ^a ,Le ^b H,Le ^a ,Le ^b				A, H		B, H	H	M P S	Substances présentes dans les sécrétions

- Le le, Se se, ABO, sont des systèmes génétiques indépendants, se et le sont inactifs.
- Les parenthèses signifient qu'un gène ne réalise pas totalement la transformation du produit résultant de l'action de son prédécesseur.

L'étude chimique a permis de préciser les relations existant entre substances A,B,H,Le^a, mais avant de l'aborder il est nécessaire de préciser les points suivants :

- méthodes utilisées pour la mise en évidence des substances de groupe sanguin,
- sources des substances de groupe sanguin et méthodes d'extraction.

a) Mise en évidence

Une agglutination spécifique se produit lorsqu'un anti-corps homologue est mis en contact avec un antigène A ou B présent à la surface de l'hématie ; on sait l'importance d'une telle réaction dans la pratique du groupage A,B,O ; elle se prête mal à une détermination quantitative, détermination qui se pratique plus aisément sur un antigène en solution. Au niveau des hématies, les substances de groupe sont alcoolosolubles et particulièrement difficiles à extraire ; aussi la plupart des études ont porté sur les sécrétions, où l'on rencontre une forme hydrosoluble que l'on a surtout étudiée au moyen des techniques suivantes :

- Inhibition de l'agglutination .

Lorsque la solution étudiée contient des substances de groupe sanguin, celles-ci peuvent absorber en tout ou partie les anticorps d'un sérum anti et abaisser son titre (KABAT (147)). On ne peut tenir compte que des absorptions qui atteignent au moins 3 tubes dans des dilutions successives par des multiples de 2.

- Tests quantitatifs de précipitation .

Mise au point par HEIDELBERGER et KENDALL (148) pour l'étude des antigènes bactériens, cette technique a été appliquée par KABAT et Coll. (149) à l'étude des substances de groupe sanguin : lorsque antigène et anticorps forment, après réaction, un complexe insoluble et lorsque le titre d'un des réactifs est connu, on peut apprécier le second en étudiant la composition chimique du précipité.

Cette réaction permet de chiffrer de manière très précise les résultats obtenus par la technique d'inhibition de l'agglutination et de comparer plusieurs substances immunologiquement voisines ; elle peut servir au contrôle de la pureté d'une substance spécifique : lorsque la totalité de la substance, ajoutée à un excès de sérum précipitant approprié, se retrouve dans le précipité, on peut conclure que la substance n'est pas contaminée.

- Inhibition de l'hémolyse .

Cette technique, principalement utilisée par BENDICH et Coll. (150), n'est citée ici que pour mémoire : elle ne s'applique qu'aux substances de groupe A et, d'autre part, les résultats sont d'autant plus nets que la substance A a subi une dénaturation qui diminue son pouvoir de réaction avec un sérum anti-A. Elle consiste à mesurer le pouvoir inhibiteur de la substance étudiée vis à vis d'un sérum hémolytique de lapin contenant des anticorps anti-A.

- Réaction de précipitation avec le sérum anti-pneumocoque type XIV.

Les érythrocytes de groupe A, B, O et AB sont agglutinables par le sérum anti-pneumocoque type XIV. Cette réaction d'abord attribuée par ANNISON et MORGAN (151), à la substance Le^a présente sur les globules est, en fait, plus générale : les formes hydro-solubles des substances A, B, O (H) et Le^a précipitent avec le sérum anti-pneumocoque type XIV. Toutes les substances précipitées ont en commun de présenter un accroissement de réactivité lorsqu'une hydrolyse ménagée a fait disparaître leur pouvoir d'inhibition de l'agglutination. L'existence de points communs entre ces différentes substances est ainsi prouvée sans équivoque.

b) Source des substances de groupe sanguin et méthodes d'extraction .

En raison des difficultés d'extraction et du faible rendement obtenu, peu d'études portent sur les substances de groupe des hématies (HALLAUER (152)). Les auteurs se sont surtout intéressés aux substances présentes dans les tissus : estomac en particulier (BENDICH & Coll. (153)), et dans les sécrétions : salive, liquide amniotique, (KABAT et Coll. (154)), liquide de kyste de l'ovaire (ANNISON et MORGAN (155)). L'étude de préparations animales permet une étude comparative, car les épreuves sérologiques ont montré la présence de substances apparentées aux substances de groupe A, B, H, chez le cheval et le porc en particulier.

Les méthodes d'extraction sont conditionnées par la nature essentiellement polysaccharidique des substances de groupe. Leur complexité s'accroît avec le degré de contamination par des substances sérologiquement inactives. L'estomac représente à ce propos un cas extrême pour lequel KABAT (156) recommande le procédé suivant :

des estomacs de porc découpés en petits fragments sont soumis à l'autolyse à 37° en tampon citrate acide chlorhydrique durant deux semaines. Le résidu d'autolyse est filtré et cinq volumes d'éthanol sont ajoutés au filtrat. Après séchage, le précipité alcoolique est extrait par une solution de phénol à 90 %, selon la technique de MORGAN et KING (157), l'activité antigénique A ou B se retrouve pour une certaine part dans le résidu phénol-insoluble, et surtout dans le précipité obtenu par addition d'éthanol à l'extrait phénolique ; la concentration

d'éthanol nécessaire à la précipitation d'un produit immunologiquement actif varie avec la quantité de phénol initialement utilisée.

c) Composition chimique .

Les substances A, B, O, H, Le^a sont formées d'une partie glucidique et d'une partie polypeptidique qui représente 22 à 25 % de la molécule. Les sucres présents en proportion variée sont : D galactose, L fucose, D acétyl glucosamine et D acétyl galactosamine, ainsi que le montre le tableau suivant :

Nombre d'échantillons	6	3	6	3	3	1
Azote %	5,9 - 6,6	5,5 - 6,1	4,2 - 5,3	3,6-6,1	4,8 - 5,6	5,3
Sucres réducteurs exprimés en glucose %	55 - 61	54 - 60	59 - 61	54 - 61	57	54
Glucosamine %	13 - 19	14 - 18	13 - 17	11 - 15	10	11,5
Galactosamine %	9 - 13	7 - 8	4,5 - 6,5	7 - 10	3,7	10,4
Glucosamine/galactosamine	1,3 - 1,9	2,1 - 2,2	2,3 - 2,8	1,5-1,7	2,7	1,1
Méthyl pentose	6,7 - 9,6	16	11 - 15	13 - 16	12	14
	muqueuse gastrique de porc à activité A	salive humaine A 2	salive B précipitée par 10 % éthanol	salive humaine A1	Substance Le ^a d'un kyste de l'ovaire	Substance O (H) d'un kyste de l'ovaire

D'après KABAT (158).

L'analyse chimique ne permet donc pas de caractériser l'une ou l'autre de ces substances, on peut simplement noter que le rapport glucosamine/galactosamine paraît plus élevé avec la substance Le^a qu'avec la substance A.

D'autres résultats empruntés à GIBBONS et Coll. (159) montrent que la substance B est particulièrement riche en galactose, que la substance A contient plus de galactosamine que les substances B et O (H).

Enfin, même dans des préparations très purifiées de substance A, B, Le^a, on peut mettre en évidence de l'acide sialique, mais celui-ci peut être éliminé par hydrolyse ménagée sans altérer la spécificité. (STALH (160)).

Quant aux acides aminés, onze d'entre eux ont été caractérisés : lysine, arginine, acide aspartique, thréonine, proline, valine, leucine, acide glutinique, glycine, sérine, alanine. Toutes les préparations paraissent riches en thréonine et en proline, mais pour une substance donnée, on note de grandes variations dans la teneur en amino-acide, la partie polypeptidique apparaît donc sans grande importance dans la spécificité : AMINO F. et Coll. (161), CARSTEN et KABAT (162).

Le peptide paraît néanmoins très important dans le maintien de la structure secondaire des substances spécifiques, comme le montrent certaines actions enzymatiques : trypsine et pepsine sont sans action apparente, par contre, après traitement par la ficine ou la papaine, on note une baisse importante dans l'activité antigénique vis-à-vis de l'anticorps correspondant ; après un tel traitement, on ne recueille pas de fragments oligo-saccharidiques ni d'acides aminés dialysables, on peut donc penser qu'il y a simplement eu rupture en fragments glucido-protidiques de grande taille avec, comme corollaire, la perte de la structure secondaire initiale, (MORGAN et Coll. (163)).

Les méthodes physiques habituelles assignent un poids moléculaire voisin de 300.000 aux substances A, H, Le^a (KERWICK (164)). Tous ces composés sont stables à la chaleur (MORGAN et KING (165)), ce qui permet de les obtenir aisément de manière stérile lorsque l'on désire neutraliser les anticorps anti-A ou anti-B d'un sang à injecter ; mais cette propriété pose aussi le problème de leur persistance dans les médicaments d'origine humaine ou animale.

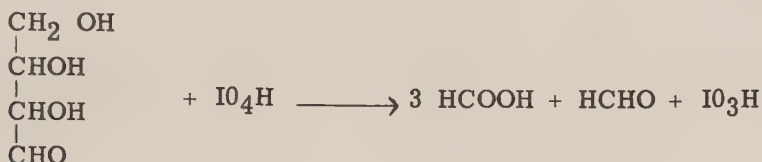
d) Structure.

Celle-ci est encore inconnue, mais, grâce aux travaux de KABAT et Coll. (166) et de MORGAN (167), un certain nombre de renseignements ont été obtenus. Ces auteurs ont employé les techniques suivantes :

- Oxydation périodique,
- Hydrolyse acide,
- Clivage enzymatique,
- Inhibition de l'activité des agglutinines par des oses simples.

Oxydation périodique :

Lorsque 2 carbones adjacents sont porteurs de groupements hydroxyles non substitués ou d'un groupe hydroxyle et d'un groupe amine primaire ou secondaire, la liaison carbone-carbone peut être rompue par l'action de l'acide périodique qui peut être représentée dans le cas d'un tétrose, de la façon suivante :

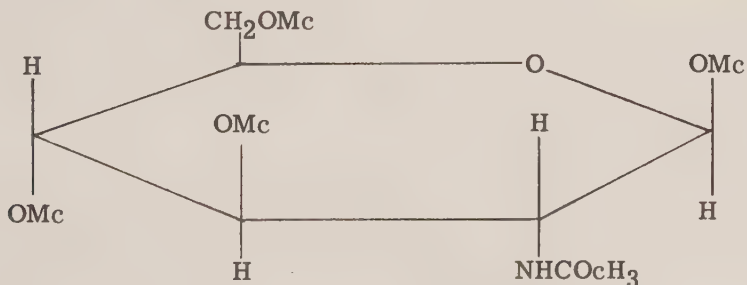


Cette méthode appliquée aux substances de groupe sanguin A ou B par AMINOFF et MORGAN (168) montre que, après action de l'acide périodique suivie d'hydrolyse acide, on retrouve du galactose, et on ne constate qu'une faible production de formaldéhyde ; ces faits s'expliquent si l'on admet que certaines molécules de galactose sont entièrement substituées et qu'à l'exception des unités terminales réductrices, il n'y a pas de groupe OH libre en position 5-6.

Ces constatations sont en faveur d'une structure ramifiée.

A l'inverse, le fucose disparaît, ce qui montre l'absence de substitution en trois et soit en deux, soit en quatre. Ceci prouve, en outre, sa situation en position externe ou terminale.

Ces résultats peuvent être confirmés par méthanolyse (BRAY et Coll. (169)) avec la substance A, on obtient une forte proportion de 2-3-4 triméthyl L fucoside et une faible quantité de N-acétyl 3-4-6 triméthyl-D-glucosaminide.



Hydrolyse ménagée :

Selon KABAT et Coll. (170) et GIBBONS (171), on obtient, en milieu acide, des di ou trisaccharides capables d'inhiber la réaction de précipitation entre sérum anti et substance de groupe intacte. Il est à noter que, dans le cas de la substance de groupe A, un trisaccharide doté d'un fort pouvoir inhibiteur dans la réaction d'hémagglutination ne présente aucun pouvoir inhibiteur vis-à-vis d'un sérum

hémolytique anti-A. Toujours dans le cas de la substance A, les fragments encore capables de réagir avec un anti-sérum présentent un reste N-acétyl galactosamine non réducteur, reste qui peut, par contre, être éliminé de la substance B sans grande modification de l'activité sérologique : l'activité, dans ce cas, serait conditionnée par la liaison galactose-galactose. Dans le cas de substance H et Le^a après hydrolyse acide, il y a une libération importante du fucose, et augmentation de réactivité avec le sérum anti-pneumocoque XIV.

Ainsi mesure-t-on l'importance que peuvent revêtir des molécules simples, di ou trisaccharides, dans les réactions sérologiques. Elles montrent que dans le cas de la substance H, il semble que des résidus fucose soient venus se greffer sur des substances dont l'activité sérologique est voisine du pneumocoque type XIV.

Clivage enzymatique :

Les enzymes de l'hépto-pancréas (NEUBERGER et PITT (172)) de certaines espèces d'*Helix* produisent sur les substances A et H une action similaire à celle de l'hydrolyse acide ménagée, tant dans les produits libérés que dans les modifications sérologiques observées.

Les enzymes bactériens (CRUMPTON et MORGAN (173) SPRINGER et Coll. (174)), ont fourni de nombreux renseignements ; plus particulièrement ils ont montré la transformation possible de la substance A ou B en substance H. Des résultats similaires peuvent être obtenus à l'aide des enzymes de *Trichomonas foetus* (WATKINS (175) qui possède, en outre, une enzyme capable de transformer une substance d'activité H en substance d'activité Le^a avec libération de fucose.

Emploi d'oses simples :

L'emploi de sucres simples comme inhibiteurs d'agglutinines végétales ou d'iso-anticorps confirme les résultats précédents : les oses les plus actifs sont les mêmes que ceux mis en évidence dans les di et trisaccharides obtenus par hydrolyse ménagée et capables d'inhiber la réaction de précipitation entre sérum anti et substance de groupe intacte.

Le fucose (WATKINS et MORGAN (176)) peut inhiber les propriétés anti-H d'un sérum d'anguille ou de la lectine de *Lotus tetragonolobus*, un disaccharide à base de galactosamine et de galactose (D N acétyl galactosoylamine (1 - 3) D galactose) a un comportement voisin de la substance A.

Le D-galactose, surtout lorsque son extrémité réductrice est engagée dans un di ou un trisaccharide, inhibe fortement un sérum anti-B (SPRINGER et GYÖRGY (177)).

Cette possibilité réactionnelle de molécules simples appelle une remarque : la présence de substances de groupe sanguin est

parfois recherchée par la technique d'inhibition de l'agglutination ; en cas de positivité, toute réaction devrait donc être contrôlée soit par dialyse du produit étudié, ou mieux par extraction phénolique selon KABAT.

c) Conclusion :

Les études précédentes montrent l'importance des oligosaccharides dans la spécificité A, B, H, Lea, alors que d'autres sont caractéristiques des substances A et B.

1/ Communs aux hydrolysats des substances A, B, H, Lea :

β Gal - (1 $\rightarrow$ 3) -	GNAc	(Schiffman (178), Coté (179))
β Gal - (1 $\rightarrow$ 4) -	GNAc	(Schiffman (178), Coté (179))
β GNAc-(1 $\rightarrow$ 3) -	Gal	(Schiffman (178), Coté (179))
β Gal - (1 $\rightarrow$ 3) -	GalNac	(Painter (180))
β Gal - (1 $\rightarrow$ 3) - β -	GNAc - (1 $\rightarrow$ 3) -	Gal (Vaijayanti (181))
β Gal - (1 $\rightarrow$ 4) - β -	GNAc - (1 $\rightarrow$ 3) -	Gal (Vaijayanti (181))
β GNAc-(1 $\rightarrow$ 3) - β -	Gal - (1 $\rightarrow$ 3) -	GalNac (Vaijayanti (181))

2/ Présents seulement dans les hydrolysats de substance A :

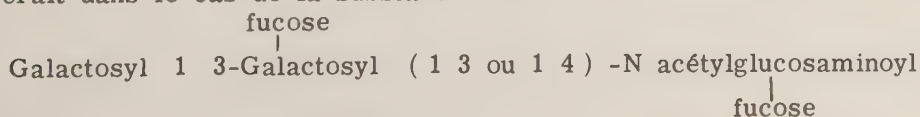
α GalNac - (1 $\rightarrow$ 3) -	Gal	(Schiffman (182), Coté (183))
α GalNac - (1 $\rightarrow$ 3) - β -	Gal - (1 $\rightarrow$ 3) -	GNAc (Schiffman (182), Coté (183))
α GalNac - (1 $\rightarrow$ 3) - β -	Gal - (1 $\rightarrow$ 4) -	GNAc (Schiffman (182), Coté (183))

3/ Présents seulement dans les hydrolysats de substance B :

α Gal - (1 $\rightarrow$ 3) -	Gal	(Painter (184))
α Gal - (1 $\rightarrow$ 3) - β -	Gal - (1 $\rightarrow$ 3) -	GNAc (Painter (184))
α Gal - (1 $\rightarrow$ 3) - β -	Gal - (1 $\rightarrow$ 4) -	GNAc (Painter (184))
(Gal = galactose		
GNAc = glucosamine		
GalNac = galactosamine).		

Aucun de ces oligosaccharides ne contient de fucose alors que l'on sait toute l'importance de cet ose dans la spécificité H et Lea et son rôle dans le trisaccharide spécifique de la substance Lea^a; (MORGAN (185)); selon VAIJAYANTI (186), le fucose, de même que l'acide sialique qui entre dans la composition des substances de groupe sanguin sans intervenir apparemment dans la substance, seraient présents sous forme de chaînes latérales éliminées par hydrolyse bien avant que la chaîne principale ne soit scindée en oligosaccharides.

Selon SCHIFFMAN et Coll., la structure essentielle serait dans le cas de la substance B :



2 / Recherche des substances de groupe sanguin dans les extraits placentaires.

Préparation des extraits placentaires :

Elle est réalisée selon la technique antérieurement décrite, chaque extrait étant obtenu à partir d'un seul placenta.

Absorption des agglutinines :

On laisse à la température du laboratoire, un mélange de la solution étudiée, en contact avec un égal volume de sérum anti-A ou anti-B préalablement amené au titre de 1/16 ou 1/8. Après deux heures, une centrifugation permet de séparer un liquide limpide dont l'activité est titrée comparativement au sérum initial dilué de moitié.

Titrage :

Ce titrage est effectué en diluant le liquide étudié selon une progression géométrique de raison 1/2 et en ajoutant à 0,5 ml diluat, 1 goutte de suspension d'hématies lavées, à 5×10^5 par millimètre cube. La lecture a lieu au miroir concave après deux heures de séjour à la température du laboratoire.

Résultats :

Outre le pouvoir inhibiteur de l'extrait placentaire, nous avons déterminé :

- le pouvoir sécréteur de la mère,
- le groupe de l'enfant.

Sur dix extraits placentaires obtenus à partir d'une mère de groupe A, six présentent un pouvoir inhibiteur anti-A.

Sur sept extraits placentaires obtenus à partir d'une mère de groupe B, deux présentent un pouvoir inhibiteur à l'égard d'un sérum anti-B.

On ne constate pas de corrélation du pouvoir inhibiteur :

- avec le pouvoir sécréteur,
- avec le groupe de l'enfant,

comme le montrent nos résultats regroupés dans le tableau suivant .

TABLEAU I

Pouvoir inhibiteur des extraits placentaires vis-à-vis d'un sérum anti-A			
Groupe	Mère Pouvoir sécréteur	Groupe de l'enfant	Pouvoir inhibiteur
A	+	A	+
A	+	A	+
A	+	A	+
A	+	A	O
A	+	A	O
A	O	A B	O
A	O	A	+
A	O	A	+
A	O	A	O
A	O	A B	+
Pouvoir inhibiteur des extraits placentaires vis-à-vis d'un sérum anti-B			
B	+	B	O
B	+	A B	O
B	+	A B	O
B	O	A B	O
B	O	B	O
B	O	B	+
B	O	A B	+
B	O	A B	O

Dans une deuxième série d'expériences rapportées dans le tableau II, chaque placenta fournit deux extraits :

- un extrait réalisé dans les conditions précédemment décrites : extrait brut.
- un extrait réalisé après lavage préalable d'un broyat placentaire : en vue d'éliminer les hématies responsables éventuelles d'un apport en substances de groupe sanguin : extrait lavé.

En outre, la teneur en glucides, exprimée en $\%$ de glucose p. 1.000, est déterminée par l'anthrone sulfurique.

TABLEAU II

Pouvoir inhibiteur d'extraits placentaires
vis-à-vis de sérum anti-A ou anti-B

Extraits de placentas	Groupe de la mère	Groupe de l'enfant	Teneur en glucides	Pouvoir inhibiteur anti-A	Pouvoir inhibiteur anti-B
1 Brut	0	0	290	+	0
lavé			110	0	0
2 Brut	?	?	540	0	0
lavé			220	0	0
3 Brut	0	0	236	0	+
lavé			124	0	+/-
4 Brut	B	?	600	0	+
lavé			210	0	+
5 Brut	0	?	680	0	+
lavé			290	0	+/-
6 Brut	0	0	280	0	0
lavé			155	0	0
7 Brut	0	A	380	+	0
lavé			95	+/-	0
8 Brut	0	B	280	0	+
lavé			124	0	0
9 Brut	0	0	170	0	0
lavé			195	0	0

On note de grandes variations individuelles dans la teneur en glucides ; néanmoins, le taux est toujours plus faible lorsque les placentas sont soumis à un lavage préalable à la préparation des extraits.

On constate que, selon les cas, le lavage préalable modifie ou ne modifie pas le pouvoir inhibiteur des extraits placentaires.

Lorsqu'il existe un pouvoir inhibiteur, celui-ci disparaît après lavage (cas 1 et 8), ou lorsqu'il persiste (cas 3), ne peut être rattaché au groupe de la mère ou de l'enfant, il ne s'agit donc pas d'inhibition spécifique.

Les phénomènes d'inhibition constatés pour les cas 4 et 5, bien qu'ils puissent théoriquement être rapportés au groupe de la mère au moins pour le cas 4, peuvent également s'expliquer par des phénomènes non spécifiques en raison de la teneur particulièrement élevée en glucides constatée dans ces deux cas.

Il nous a paru alors intéressant de confirmer l'absence de substances de groupe sanguin dans les extraits placentaires, non pas en opérant sur les extraits eux-mêmes, extraits dont on sait la complexité et dont le dosage des glucides par l'anthrone ne révèle qu'un aspect, mais après extraction des antigènes par le phénol à 90%, selon la technique de MORGAN et KING (189) nous avons préparé neuf extraits placentaires qui, après lyophilisation furent traités par le phénol, l'extrait phénolique étant ensuite fractionné par différentes concentrations d'éthanol : le volume de phénol utile à l'extraction, varie en effet selon la complexité du mélange étudié, et conditionne la quantité d'éthanol nécessaire à la précipitation des substances de groupe sanguin ; généralement, ce volume d'éthanol n'excède pas 12 p. 100 de la concentration initiale de phénol ; nous avons néanmoins étudié les précipités obtenus après addition de 10, 20 et 30 p. 100 d'éthanol à l'extrait phénolique.

Les neuf extraits placentaires se répartissaient de la manière suivante :

- 2 extraits placentaires mère 0, enfant 0, pris comme témoins éventuels
- 2 extraits placentaires mère A, enfant A
- 3 extraits placentaires mère A, enfant ?
- 1 extrait placentaire mère A, enfant 0
- 1 extrait placentaire mère 0, enfant A
- 1 extrait placentaire mère B, enfant ?
- 1 extrait placentaire mère AB, enfant B
- 1 extrait placentaire mère AB, enfant ?

Nous n'avons constaté, dans les différentes fractions obtenues, aucun pouvoir inhibiteur, tant à l'égard de sérum anti-A, que de sérum anti-B.

Néanmoins, la technique originale de KABAT s'appliquant à des broyats d'organes en tampon acide additionnés ou non de pepsine selon leur origine, nous l'avons intégralement respectée en répétant nos expériences, non plus sur des extraits placentaires, mais sur des autolysats pepsiques de placenta.

Nous n'avons pu nous procurer un échantillon de pepsine rigoureusement pure, et tous les lots que nous avons essayés étaient contaminés par des substances de groupe A ; néanmoins, le taux de ces substances est toujours faible et, après extraction phénolique, une simple solution de pepsine à une concentration équivalente à la concentration finalement réalisée au cours de la digestion des placentas broyés, soit 0,05 p. cent, ne présente pas de pouvoir inhibiteur à l'égard d'un sérum anti-A et permet cependant d'obtenir une lyse des broyats.

Les placentas sont traités au broyeur Ultraturrax avec un égal poids de tampon citrate 0,5 M-HCl de pH 2 additionné de 0,1 p. 100 de pepsine ; en cours de digestion le pH tend à s'abaisser et il est ajusté à pH 2 chaque jour ; lorsque l'acidité du milieu ne varie plus, on filtre et on ajoute au filtrat, cinq volumes d'éthanol. Le précipité ainsi obtenu contient, entre autres, les substances sérologiquement actives ; celles-ci sont solubilisées dans une solution de phénol à 90 p. 100, puis reprécipitées par l'éthanol. La remarque que nous avons faite lors de la purification des extraits placentaires quant au rôle des proportions des réactifs lors de l'extraction phénolique s'applique ici. Aussi avons-nous étudié les précipités obtenus par addition de 10, 20, 30 p. 100 d'éthanol aux extraits phénoliques.

La répartition de ces broyats, quant au groupe sanguin des donneurs, était la suivante :

<u>Nombre d'extraits</u>	<u>Groupe de la mère</u>	<u>Groupe de l'enfant</u>
5	0	0
2	A (sécrétrice)	A
2	A (non sécrétrice)	?
1	A	0
2	A	?
1	B	B
2	B	?
1	AB	?

Dans nos conditions expérimentales, aucun des essais réalisés n'a permis la mise en évidence de substances de groupe sanguin.

3/ Recherche des substances de groupe sanguin dans quelques médicaments injectables d'origine animale.

On sait que divers tissus ou sécrétions sont riches en substance de groupe sanguin A, B, O. Dès lors, il nous a paru intéressant de vérifier si ces substances persistaient dans certains médicaments injectables autres que les extraits placentaires.

La richesse de la muqueuse gastrique de porc en substances de groupe a conduit à examiner les vaccins et les toxines préparés à partir de germes cultivés sur milieu de base de panse de porc: ces travaux ont été repris récemment par GABRIELLI (190) et par MERTZ (191). Cet auteur s'est, en outre, attaché, aux préparations obtenues par digestion pepsique.

L'étude des extraits et des broyats placentaires nous ayant montré la nécessité d'opérer sur les fractions obtenues après extraction phénolique en vue d'éliminer les réactions non spécifiques, nous avons repris ces techniques. Par ailleurs, on sait toute l'importance de certains glucides ou oligosaccharides dans les réactions d'inhibition d'agglutination ; nous avons cherché à savoir s'il était possible d'éliminer ces substances, ou tout autre inhibiteur de faible poids moléculaire, par simple dialyse.

Dialyse :

Les préparations injectables soumises à notre étude ont été placées dans un dialyseur à membrane de cellophane, contre 50 volumes de solution saline isotonique. Après vingt quatre heures de dialyse à température ordinaire, on contrôle la persistance du volume initial mis en expérience et on soumet la préparation ainsi dialysée à la réaction d'absorption parallèlement à une préparation normale, non dialysée.

Les opérations d'extraction phénolique, d'absorption des agglutinines, de titrage, sont semblables à celles que nous avons décrites pour les extraits placentaires.

Notation des résultats :

Pour simplifier la lecture des tableaux exposés ci-dessous, nous avons exprimé pour chaque essai, le nombre des tubes encore positifs dans la série témoin, et négatifs dans la série traitée par le produit étudié. Ainsi, pour une dilution active à 1/8 dans la série témoin.

Si la dilution active dans la série traitée est 1/8, pas de recul, notation 0 ;

Si la dilution active dans la série traitée est 1/4, recul d'une dilution, notation 1 ;

Si l'activité est nulle dans tous les tubes de la série traités, recul d'au moins trois tubes, notation 3.

L'absence de précipité après addition d'éthanol à l'extrait phénolique est notée par le signe - .

	EXTRACTION PHÉNOLIQUE				DIALYSE			
	ANTI A		ANTI B		ANTI A		ANTI B	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
(1) Extraits hépatiques :								
(Stago)	✓3	0	✓3	0	1	0	0	0
(Hépatrol)	✓3	—	✓3	—	✓3	0	3	0
(Robapharm)	✓3	—	✓3	—	✓3	2	1	0
(Choay)	✓3	0	✓3	0	1	0	1	0
(Rolland)	1	—	2	—	✓3	✓3	2	2
(Ficarmone)	0	—	0	—	✓3	✓3	0	0
(Hépagyl)	1	2	1	2	2	0	0	0
(2) Autres organes :								
Extrait rénal (Rénolyodes)	1	—	0	—	Extrait trouble			
— de rate (Dermosplénine)	✓3	—	0	—	✓3	1	0	0
— pancréatique (Nuclorgan)	✓3	—	✓3	—	✓3	✓3	✓3	2
— duodénal (Robuden)	✓3	—	✓3	—	✓3	✓3	✓3	1
— gastrique (Robuden)	✓3	—	✓3	—	✓3	✓3	✓3	1
— cardiaque (Robapharm)	✓3	—	✓3	—	✓3	✓3	✓3	1
— prostatique (Robapharm)	✓3	—	✓3	—	✓3	2	✓3	1
— embryonnaire (Roussel)	1	0	1	0	✓3	✓3	✓3	1
— cérébral et spinal (Antasthène) ..	1	—	0	—	✓3	✓3	✓3	1
— de moelle épinière (Hormoneuryl) ..	2	—	0	—	✓3	✓3	✓3	1
(3) Préparations hormonales :								
Gonadotrophine chorionique et antéhypophysaire (Antéparsine)	✓3	—	2	—	✓3	0	✓3	✓3
Gonadotrophine chorionique (Antélobine) ..	✓3	—	1	—	0	0	2	✓3
Gonadotrophine sérique (Roussel)	0	—	0	—	2	2	0	0
Gonadotrophine chorionique (Roussel) ..	0	—	0	—	✓3	1	✓3	✓3
ACTH (Byla)	0	—	0	—	✓3	✓3	✓3	✓3
ACTH Retard (Cortrophine)	✓3	—	0	—	0	0	✓3	0
Hormones corticosurrénales (Cortine)	0	—	2	—	✓3	2	1	1
Thyroïde (Sinbio)	0	—	0	—	✓3	2	2	✓3
Thyroïde (J. Roy)	✓3	—	1	—	2	2	2	✓3
Hormone Somatotrope	✓3	—	✓3	—	✓3	1	✓3	✓3
Hormone Thyrotrope	✓3	—	✓3	—	✓3	3	2	2
Vagotonine	✓3	—	0	—	0	1	1	1
(4) Sérums								
antipneumococcique	1	—	1	—	✓3	✓3	✓3	✓3
antirabique	0	—	0	—	✓3	✓3	✓3	✓3
antigangréneux	1	—	1	—	✓3	✓3	✓3	✓3

C O N C L U S I O N

Après avoir rappelé les principes généraux de la thérapeutique tissulaire d'après FILATOV et après avoir indiqué la préparation d'un extrait placentaire selon ces principes, nous nous sommes intéressés à l'étude de sa constitution sur le plan analytique et sur le plan des propriétés antigéniques.

Cette étude, réalisée sur plusieurs lots d'extraits, a été conduite de manière comparative sur des préparations d'origine humaine et d'origine bovine.

1) Etude analytique des constituants minéraux :

Nous avons dosé les éléments suivants : sodium, potassium, calcium, magnésium, chlore, phosphore. On ne peut s'étonner de leur présence, et leur taux n'a pas montré de variation significative selon l'origine des extraits. Toutefois, l'extrait placentaire humain est habituellement moins riche en ions minéraux excepté dans le cas des phosphates.

Nous n'avons pu déceler ni cuivre, ni fer, ni zinc, tant dans les extraits placentaires humains, que dans les extraits placentaires bovins.

2) Etude analytique des protéides :

Les réactions de mise en évidence des holoprotéides sont demeurées négatives ; il n'en est pas de même pour les peptides, glycoprotéides, nucléoprotéides. Ces trois catégories de substances étudiées principalement par électrophorèse et par spectrophotométrie paraissent assez dégradés, tant dans les extraits placentaires humains que dans les extraits placentaires bovins, et ce sont surtout leurs fractions (oses, acides aminés) que nous avons pu mettre en évidence à l'aide des réactions chimiques spécifiques et des techniques chromatographiques.

Il est ainsi possible d'affirmer la présence des acides aminés suivants :

- Amino acides directement identifiables :

Cystine
Cystéine
Alanine
Hydroxy-proline
Glycocolle
Phényl alanine
Méthionine
Tyrosine.

- Amino acides identifiables après hydrolyse :

Cystéine
Alanine
Hydroxy-proline
Glycocolle
Phényl alanine
Acide aspartique
Méthionine.

des oses suivants :

- oses directement identifiables : galactose, mannose,
- oses identifiables après hydrolyse : galactose, mannose, ribose, fucose, osamine, acide sialique.

Ces résultats sont identiques pour les préparations d'origine humaine et d'origine bovine ; ceci ne saurait surprendre, excepté dans le cas des acides sialiques. A la présence exclusive d'acide N acétyl sialique dans les glycoprotéides humaines, s'oppose la présence d'acide N acétyl sialique et d'acide N glycolyl sialique dans les glycoprotéides bovines ; au contraire, dans le cas des extraits placentaires, on ne peut mettre en évidence que de l'acide N acétyl sialique, quelle que soit l'origine de l'extrait. En raison de la grande fragilité de l'acide N Glycolyl sialique, nous pensons que celui-ci est détruit lors de la préparation de l'extrait placentaire bovin.

La mise en évidence de ribose associée aux spectres d'absorption plaide en faveur de la présence des constituants de l'acide ribonucléique. Il est, par contre, impossible de mettre en évidence du désoxyribose et nous pensons que l'acide désoxy-ribonucléique n'est pas solubilisé lors des opérations initiales de préparation des extraits placentaires.

3) Etude des propriétés antigéniques :

Comme nous venons de le voir, il semble que l'extrait étudié soit riche en molécules relativement simples ; ces molécules ne portent pas de motif antigénique identifiables par les techniques immunologiques que nous avons mises en oeuvre : hémagglutination conditionnée et immunodiffusion en gélose.

Ces mêmes molécules présentent cependant un pouvoir inhibiteur net vis-à-vis d'anti sérum A ou B ; nous avons pu démontrer qu'il ne s'agissait pas d'une réaction spécifique et que ce même phénomène se produisait lorsque certaines préparations commerciales étaient examinées dans les mêmes conditions.

— — — — —

Vu :

Clermont-Ferrand, le 19 Avril 1967

Le Président du jury :

M. COULET

Vu :

Clermont-Ferrand, le 19 Avril 1967

Le Doyen de la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie

G. MEYNIEL

Vu et Permis d'Imprimer

N° 12/67

Clermont-Ferrand, le 19 Avril 1967

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

E. LAPALUS

B I B L I O G R A P H I E

On trouvera ci-dessous les références bibliographiques; le chiffre qui leur fait suite correspond à leur ordre d'apparition dans le texte ; au préalable nous signalons quatre documents essentiels dans leur domaine respectif :

GATE J., VACHON R. - La thérapeutique tissulaire , Masson et Cie, Paris 1951.

MONTREUIL J. - Les glycoproteides, Chimie et biochimie in Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1957, T 39, suppl. n° 3.

BISERTE G. - Les glycoprotéides du sérum sanguin et de l'urine. Exploration et signification physiopathologique in Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1957, T 39, suppl. n°3.

KABAT E.A. - Blood group substances , Acad. Press, New-York, 1956.

-
- AMINOFF D., MORGAN W.T.J., WATKINS W.M. - Biochem. J., 1950, T. 46, p. 426 (108, 161).
- AMINOFF D., MORGAN W.T.J. - Biochem. J., 1951, T. 48, p. 74 (168).
- ANNISON E.F., MORGAN W.T.J. - Biochem. J., 1952, T. 52, p. 247 (151).
- ANNISON E.F., MORGAN W.T.J. - Biochem. J., 1952, T. 50, p. 460 (155).
- ARQUINT A., HAUSER A. - Schweiz. med. Wschr., 1954, T. 84, p. 648 (26 - 34).
- AWAPARA J., SATO Y. - Clin. chim. Acta., 1956, T. 1, p. 75 (130).
- AYALA W., MOORE L.U., HESS E.L. - J. clin. Invest., 1951, T. 30, p. 781 (69).
- BAAR S., BULL J.P. - Nature (London), 1953, T. 172, p. 414 (92).
- BADINAND A., MALLEIN R. - Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 1951, T. 33, p. 1307 (30).
- BARKHAL S.A., SKOLIAR L.V. - Khirurgiya Moskva, 1950, T. 3, p. 70 (23).
- BEISER S.M., KABAT E.A. - J. Immunol., 1952, T. 68, p. 19 (141).
- BENDICH A., KABAT E.A., BEZER A.E. - J. Am.chem. Soc. , 1947, T. 69, p. 2163 (142, 150).
- BENDICH A., KABAT E.A., BEZER A.E. - J. exptl Med., 1946, T. 83, p. 485 (153).

- BISERTE G. - Bull. Soc. Chim. biol., (Paris), 1957, T. 39, suppl. n° 3, p. 144 (49, 50, 51).
- BISERTE G., TAYEAU F., MONTREUIL J., HOLLEMAN J., DAUTRE VAUX M. - Clin. chim. Acta, 1956, T. 1, p. 115 (103).
- BLIX G., LINDBERG E., ODIN L., WERNER I. - Acta Soc. Med. upsalien, 1956, T. 61, p. 1 (71, 118, 123, 125, 128).
- BLIX G. - Hoppe Seyl. Z. physiol. Chem., 1936, T. 240, p. 43 (117).
- BOYDEN S.V. - J. exp. Med., 1951, T. 93, p. 107 (138).
- BRAY H.G., HENRY H., STACEY M. - Biochem. J., 1946, T. 40, p. 124 (169).
- BRIGGS A.P. - J. biol. Chem., 1924, T. 59, p. 255 (43).
- BUCHAN I., SAVAGE N. - Analyst, 1952, T. 77, p. 401 (97).
- CARSTEN M.E., KABAT E.A. - J. Am. chem. Soc., 1956, T. 78, p. 3083 (162).
- CHARGRAFF E., DAVIDSON J.N. - The nucleic acids, Acad. Press New York, 1955 (136).
- CHARTIER J., VAN KLAVERDEN F.W., VAILLANCOURT G. - Chromatography, 1958, T. 1, p. 317 (133).
- COTE R.H., MORGAN W.T.J. - Nature (London), 1956, T. 178, p. 1171 (179, 183).
- COTTE J., BUREAU M. - Labo Pharma., 1959, T. 7, p. 9 (6, 11, 31, 39).
- CRUMPTON M.J., MORGAN W.T.J. - Biochem. J., 1953, T. 54, p. 32 (173).
- CUVELIER R., TRONCHE P. - 68 Congrès AFAS Clermont-Ferrand, 1949, (14).
- DEDONDER R. - C.R. Acad. Sci., (Paris), 1950, T. 230, p. 997, (95).
- DELANNOY E. - Concours méd., 1952, T. 74, p. 1853 (29, 36).
- DENIGES G. - C.R. Acad. Sci. (Paris), 1927, T. 185, p. 777 (42).
- DEUTSCH H.F. - Fed. Proc., 1953, T. 12, p. 196 (110).
- DISCHE Z. - Mikrochemie, 1929, T. 7, p. 33 (56).
- DISCHE Z. - J. biol. Chem., 1953, T. 204, p. 983 (57).
- DISCHE Z. - Mikrochemie, 1930, T. 8, p. 4 (60).
- DISCHE Z., SCHWARTZ K. - Mikrochim Acta, 1937, T. 2, p. 13 (59).
- DISCHE Z., SHETTLES L.B. - J. biol. Chem., 1948, T. 175, p. 595 (62).
- DIXON A. - Biochem. J., 1955, T. 60, p. 165 (84).
- DREVON B., DONIKIAN R. - Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1955, T. 37, p. 1321 (45).
- ELSON L.A., MORGAN W.T.J. - Biochem. J., 1933, T. 27, p. 1824 (65).
- FAURE R.M. - Thèse Med., Paris, 1957 (44).
- FINE J.M., GROULADE J., SAINT PAUL M., TIZZONI R.J. - Biol. med. (Paris), 1956, T. 6, p. 596 (104).
- FISCHER F.G., NEBEL H.J. - Hoppe Seyl Z. physiol. Chem., 1955, T. 301, p. 224 (114).
- FRIEDENREICH V., HARTMAN G. - Z. Immunit. 1938, T. 92, p. 141 (144).
- FILATOV V.P. - Archiv Angeneilck, 1933, p. 467 (1, 13, 16).
- FILATOV V.P. - Sovetsk Med., 1943, T. 10, p. 7 (3, 37).

- FILATOV V.P. - Oftal Z, 1946, T. 3, p. 16 (7).
- FILATOV V.P. - Vestn. Oftal, 1946, T. 25, p. 3 (18).
- FILATOV V.P., BIBER V.A. - Doklady Akad Nauk, 1948, T. 62, p. 555 (2, 33).
- FILATOV V.P., VERBISTSKA F. - Amer. Rev. Soviet Med., 1946, T. 3, p. 397 (17).
- GABRIELLI G. - Atti. Soc. Tox. Sci. Nat., 1961, T. 48, p. 193 (190).
- GALENTI H. - Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1958, T. 40, p. 265 (112).
- GARDELL S., HEIJKENSJOLD F., ROCHNORLUND A. - Acta chem. scand., 1950, T. 4, p. 970 (116).
- GATE J., VACHON R. - La thérapeutique tissulaire, Masson et Cie, Paris, 1951 (4, 32, 35, 133).
- GIBBONS R.A., MORGAN W.T.J., GIBBONS M. - Biochem J., 1955, T. 60, p. 428 (159, 171).
- GLYNN L.E., HOLBOROW E.J. - Brit. med. Bull., 1959, T. 15, p. 150 (145).
- GOA J. - Scand. J. clin. Lab. Invest., 1957, T. 7, suppl. 22, p. 56 (64).
- GOTTSCHALK A. - Sialic Acids, Cambridge university Press, 1960 (122).
- GOTTSCHALK A., ADA G.L. - Biochem. J., 1956, T. 62, p. 681 (83, 101, 129).
- GOTTSCHALK A., GRAHAM F. - Biochem. Biophys. Acta (Amst.), 1959, T. 34, p. 381 (119).
- HALLAUER C. - Z Immunit., 1934, T. 83, p. 114 (152).
- HAVEZ R. - Thèse Med., Lille, 1956 (55).
- HEIDELBERGER M., KENDALL F.E. - J. exptl. Med., 1932, T. 55 p. 555 (148).
- JAYLE M.F., BOUSSIER G. - Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1954, T. 36, p. 959 (104).
- JERMYN M.A., ISHERWOOD F.A. - Biochem. J., 1949, T. 44, p. 402 (79, 93, 111).
- JOHANSON R. - Nature (London), 1953, T. 172, p. 956 (98).
- KABAT E.A. - Blood group substances, Acad Press N.Y., 1956 (147, 156, 158).
- KABAT E.A., BAER H., BEZER A.E., KNAUB V. - J. exptl. Med., 1948, T. 88, p. 43 (166).
- KABAT E.A., BENDICH A., BEZER A.E. - J. exptl. Med., 1946, T. 83, p. 485 (107).
- KABAT E.A., BENDICH A., BEZER A.E., BEISER S.M. - J. exptl. Med., 1947, T. 85, p. 685 (154).
- KABAT E.A., LESKOWITZ S. - J. am. chem. Soc., 1955, T. 77, p. 5159 (170).
- KABAT E.A., MURRAY J. P. - J. biol. Chem., 1950, T. 182, p. 251 (149).
- KERWICK R.A. - Biochem. J., 1952, T. 52, p. 259 (164).
- KRAMM D.E., KOLB C.L. - Anal. Chem., 1955, T. 27, p. 1079 (48, 52).
- LANDSTEINER K. - J. exp. Med., 1936, T. 63, p. 185 (109).
- LEITNER J.C., KERBY G.P. - Stain Technol., 1954, T. 29, p. 257 (46).

- MAC MANUS J.F.A. - Nature (Lond.), 1946, T. 158, p. 202 (47).
- MARTENSON A., RAAL A., SVENNERHOLM L. - Biochem. biophys. Acta (Amst.) 1957, T. 23, p. 652 (121, 124).
- MASSON M., BETOURNE P., BOIZEAU M. - Vie méd., 1955, T. 36, p. 1391 (40).
- MAUGHAN G.B., EVELYN K.A., BROWN J.S.L. - J. biol. Chem., 1938, T. 126, p. 567 (58).
- MERCIER A. - Bull. Soc. Ophtal. Paris, 1948, p. 133 (21).
- MERTZ V.E. - Praxis, 1961, T. 50, p. 1011 (191).
- MEYER J. - Bull. Soc. fr. Derm. Syph., 1949, T. 6, p. 1176 (27).
- MONTREUIL J. - Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1957, T. 39, suppl. n° 3 (66, 68, 82, 88, 90).
- MONTREUIL J., SCHEPPLER N. - Bull. Soc. Chim. biol. (Paris), 1959, T. 41, p. 13 (87).
- MOULLEC J. - In Cours d'immunologie générale et de sérologie de l'Institut Pasteur, C D U Paris, 1962 (146).
- MORGAN W.T.J. - Proc. Roy. Soc., 1960, T. 151, p. 308. (167, 185).
- MORGAN W.T.J., KING H.K. - Biochem. J., 1943, T. 37, p. 640, (140, 157, 165, 189).
- MORGAN W.T.J., PUSZTAI A. - Biochem. J., 1961, T. 81, p. 648, (163).
- MORGAN W.T.J., WATKINS W.M. - Nature (Lond.), 1956, T. 177, p. 521.
- NECHITCH G.P. - Ann. Occulist., (Paris), 1951, p. 118 (8).
- NEUBERGER A., PITT RIVERS R.V. - Biochem. J., 1939, T. 33, p. 1580 (172).
- NEUEUSCHWANDER M. - Praxis, 1947, T. 36, p. 958 (19).
- OGUR M., ROSEN G. - Arch. Biochem., 1950, T. 25, p. 262 (135).
- OUCHTERLONY O. - Arkiv. Kemi Min. Geol., 1949, T. 26, p. 1 (139).
- PAINTER T.J., WATKINS W.M., MORGAN W.T.J. - Nature (Lond.) 1962, T. 193, p. 1042 (180).
- PAINTER T.J., WATKINS W.M., MORGAN W.T.J. - Nature (Lond.) 1963, T. 199, p. 282 (184).
- PARTRIDGE S.M. - Biochem. J., 1948, T. 42, p. 238 (85, 91, 94, 96, 115).
- POTTERAT M. - Mitt. Lehensm., 1956, T. 47, p. 66 (80).
- PULS W., ALBAUM K.H. - Clin. chim. Acta, 1955, T. 1, p. 387 (54).
- RAPOPORT S., BUCHANAN D.J. - J. biol. Chem., 1951, T. 192, p. 251 (106).
- RAUCH S., ZENDER A., KOSTLIN A. - Helv. med. Acta, 1956, T. 23, p. 75 (9, 12).
- RAYNAUD R., D'ESHOUGES J.R., PASQUET P., PASQUET V. - Ann. Med., 1954, T. 1, p. 55.
- REBIERE J.P. - Thèse pharm., 1961, Clermont-Fd, (38).
- RENARD G. - Bull. Soc. Ophtal. Paris, 1949, p. 522 (5).
- ROMANI J.D. - Presse méd., 1954, T. 76, p. 1579 (53).
- SCHALES O., SCHALES S.S. - J. biol. Chem., 1941, T. 140, p. 879 (41).
- SCHIFFMAN G., KABAT E.A., LESKOWITZ S. - J. Amer. chem. Soc., 1962, T. 84, p. 73 (178, 182).
- SCHIFFMAN G., KABAT E.A., LESKOWITZ S. - Biochemistry, 1964, T. 3, p. 587 (187).

- SONNET J. - Les glycoprotéines sériques à l'état normal et à l'état pathologique, Ed. Arscia, Bruxelles, 1956 (67, 81, 89, 113).
- SOURDILLE G.P. - Bull. Soc fr. Opht. Paris, 1949, p. 551 (20).
- SPRINGER G.F., WILLIAMSON P., BRANDES W.C. - J. exptl. Med., 1961, T. 113, p. 1077.
- SPRINGER G.F., GYÖRGY E. - Fed. Proc., 1953, T. 12, p. 272 (143, 177).
- STACEY M., WOOLEY J.M. - J. chem Soc., 1942, p. 550 (105).
- SVENNERHOLM L. - Biochim. biophys. Acta (Amst.), 1957, T. 24, p. 604 (72).
- SVENNERHOLM L. - Acta chem. Scand., 1955, T. 9, p. 1033 (120).
- SVENNERHOLM L. - Acta Soc. Med. upsalien, 1956, T. 61, p. 75 (126)
- SVENNERHOLM E., SVENNERHOLM L. - Nature (London), 1958, T. 181, p. 1154 (127).
- SCHNEIDER W.C. - J. biol. chem., 1945, T. 161, p. 293 (134).
- SEGAL C., PAVE L. - Klin. Oczna., 1948, T. 18, p. 531 (22).
- STALH A.J.C. - Biol. med. (Paris), 1963, T. 52, p. 283 (160).
- TAYEAU F., BISERTE G., MONTREUIL J., MARQUEVIEILLE S. - C.R. Acad. Sci. (Paris), 1953, T. 237, p. 627 (102).
- TOENIES G., KOLB J.J. - Analyt. Chem., 1951, T. 23, p. 823 (132).
- TORTA J. - Ann. Histochem., 1950, T. 5, p. 76 (28).
- TERRASSE J., CUVELIER R., CHARDON N. - Concours med., 1952, T. 74, p. 4153 (15).
- UZON M., DZIRI A. - Tunis med., 1951, T. 8, p. 949 (10).
- VACHON G., RENDU G. - Lyon med., 1951, T.22, p. 365 (25, 133).
- VALJAYANTI P.R., PAINTER T.J., WATKINS W.M., MORGAN W.T.J. - Nature (London), 1963, T. 200, p. 532 (181, 186).
- WARAVDEKAR V.S., SASLAW L.D. - J. biol. chem., 1959, T. 234, p. 1945 (74, 78, 137).
- WARREN L. - J. biol. chem., 1959, T. 234, p. 1971 (73, 77).
- WATKINS W.M. - Biochem. J., T. 71, p. 261 (175).
- WATKINS W.M., MORGAN W.T.J. - Nature (London), 1952, T. 169, p. 825 (176).
- WATKINS W.M., MORGAN W.T.J. - Nature (London), 1957, T. 180, p. 1308 (188).
- WERNER I. - Acta chem. scand., 1951, T. 5, p. 1936 (99).
- WERNER I., ODIN L. - Acta Soc. Med. upsalien, 1952, T. 57, p.230 (70, 75).
- WERNER I., ODIN L. - Acta Soc. Med. upsalien, 1949, T. 54, p. 69 (100).
- WERTHEIMER P., MAYER M. - Lyon chir., 1951, T. 46., p. 78 (24).
- WINZLER R.J. - Meth. biochem. Anal., Interscience publishers New York, 1955, vol. 2, (61, 63, 76).
- WOIWOOD A., LINGOOD F.V. - Nature (London), 1949, T. 163, p. 218 (131).
- YAMASHINA I. - Acta chem.scand., 1956, T. 10, p. 166 (86).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.

ETUDE ANALYTIQUE .

A/ Constituants minéraux.....	p. 13
B/ Protéides	p. 17
1 - Peptides	p. 18
2 - Glycoprotéides	p. 19
a) électrophorèse	p. 19
b) caractérisation des oses	p. 23
1°) Réactions chimiques applicables à la dé- tection et au dosage des oses	p. 23
2°) Généralités sur l'étude chromatographique des oses	p. 32
3°) Etude chromatographique des aldoses ...	p. 33
4°) Etude chromatographique des osamines..	p. 40
5°) Etude chromatographique des acides sialiques	p. 42
6°) Etude des chromatogrammes en lumière de Wood	p. 46
c) étude chromatographique de la partie pro- téique	p. 47
3 - Nucléoprotéides.....	p. 51

RECHERCHE DES PROPRIETES ANTIGENIQUES .

A/ Antigènes tissulaires	p. 59
B/ Antigènes du système A, B, O	p. 62
1°) Généralités	p. 62
2°) Recherche des substances de groupe sanguin dans les extraits placentaires	p. 73
3°) Recherche des substances de groupe sanguin dans quelques médicaments injectables d'ori- gine animale	p. 78

CONCLUSION	p. 81
------------------	-------

